



Nouvelles applications des nanoparticules organiques : de la vectorisation d'un mélange d'actifs à travers la peau jusqu'au développement d'un test diagnostique in vitro de l'allergie aux parfums

Angèle Cortial

► To cite this version:

Angèle Cortial. Nouvelles applications des nanoparticules organiques : de la vectorisation d'un mélange d'actifs à travers la peau jusqu'au développement d'un test diagnostique in vitro de l'allergie aux parfums. Ingénierie biomédicale. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10018 . tel-01213950

HAL Id: tel-01213950

<https://theses.hal.science/tel-01213950>

Submitted on 9 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

**ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES – SANTE
Spécialité INGENIERIE BIOLOGIQUE ET MEDICALE, BIOTECHNOLOGIE**

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 30 Janvier 2015

par

Angèle CORTIAL

**NOUVELLES APPLICATIONS DES NANOPARTICULES ORGANIQUES : DE LA
VECTORISATION D'UN MELANGE D'ACTIFS A TRAVERS LA PEAU JUSQU'AU
DEVELOPPEMENT D'UN TEST DIAGNOSTIQUE *IN VITRO* DE L'ALLERGIE AUX
PARFUMS**

Directeurs de thèse: **Pr Stéphanie BRIANCON et Pr Jean-François NICOLAS**

JURY

Pr Hatem Fessi
Pr Marie-Christine ANDRY
Pr Gilberte MARTI-MESTRES
Pr Marc PALLARDY
Dr Brigitte ILLEL
Dr Fabrice BATTAIS
Dr Marc VOCANSON
Pr Stéphanie BRIANCON
Pr Jean-François NICOLAS

Président du Jury
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Membre invité
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

*A mes parents, Marie-Eve, Michel & Lise, et à Noé.
« Labor omnia vincit improbus »*

SOMMAIRE

Remerciements	1
Principales abréviations.....	3
Introduction	5
 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	 7
 Chapitre 1: Nanoparticules, outils d'innovation dans le domaine biomédical	 8
1. Définition du terme : « nanoparticules »	8
1.1. Norme ISO TS/27687	8
1.2. Définition de l'Union Européenne 2011/696/UE	8
1.3. Définition du Règlement cosmétique européen	9
2. Développement de nanoparticules et « drug delivery »	9
2.1. Les différents types de NPs.....	10
2.2. Nanoparticules et enjeux thérapeutiques	15
2.3. Nanoparticules, outils de diagnostic	17
2.4. Nanoparticules et théranostiques	17
2.5. Toxicité des NPs.....	18
3. Utilisation des micro / nanoparticules en dermatologie	21
4. Conclusion	35
 Chapitre 2: Nanoparticules, encapsulation de molécules odorantes	 36
1. Stratégie de microencapsulation	36
1.1. Les différentes classes de procédés	37
1.2. Matériaux mis en œuvre	39
1.3. Monomères utilisés.....	41
1.4. Additifs	42
2. Description des différentes méthodes d'encapsulation	43
2.1. Les méthodes physico-chimiques	43
2.2. Les méthodes chimiques	48
2.3. L'inclusion moléculaire	50
2.4. Les méthodes mécaniques.....	51

3.	Développement des nanoparticules ou de particules submicroniques odorantes	57
3.1.	La nanoprécipitation	58
3.2.	Les méthodes de polymérisation	59
3.3.	Les méthodes basées sur l'homogénéisation	60
3.4.	Homogénéisation par ultrasons	64
4.	Conclusion	66

Chapitre 3: Nanoparticules, les enjeux de l'application topique

1.	La fonction « barrière » de la peau	67
1.1.	La couche cornée : première barrière à la pénétration cutanée	68
1.2.	L'épiderme « viable » : seconde couche de protection	70
1.3.	Le derme : troisième couche de protection	71
1.4.	Une autre ligne de défense	72
2.	Processus de l'absorption cutanée	73
2.1.	Les voies de pénétration	74
2.2.	Modélisation mathématique de la pénétration cutanée	82
2.3.	Facteurs influençant la pénétration cutanée	84
2.4.	Les modèles d'étude de la pénétration cutanée	85
3.	La pénétration des particules dans la peau	91
3.1.	Pénétration des particules en fonction de leur taille	91
3.2.	Pénétration des particules en fonction de leur charge électrique de surface	100
3.3.	Pénétration des particules en fonction du coefficient de partage	101
3.4.	Pénétration des particules en fonction du type de NPs	102
3.5.	Pénétration des particules en fonction de la formulation	103
4.	Conclusion	104

Chapitre 4: Nanoparticules et eczéma allergique de contact, outils d'innovation

1.	Allergie aux parfums	106
1.1.	Epidémiologie et caractérisation des molécules sensibilisantes	106
1.2.	Réglementation européenne	110
2.	L'eczéma allergique de contact - Généralités	112
2.1.	Aspects cliniques de l'EAC	112
2.2.	Histopathologie de l'EAC	113

3.	Physiopathologie de l'eczéma allergique de contact.....	122
3.1.	Etudes des différentes phases de l'EAC	122
3.2.	Différence de sensibilisation après contact avec un haptène fort ou faible	123
3.3.	Mécanismes mis en jeu lors de la phase sensibilisation	124
3.4.	Mécanismes mis en jeu lors de la phase de déclenchement.....	131
3.5.	Mécanismes mis en jeu lors de la phase de régulation	131
4.	Diagnostic de l'eczéma allergique de contact aux parfums	132
4.1.	Interrogatoire clinique	132
4.2.	Les tests cutanés.....	132
4.3.	Développement de tests immunobiologiques.....	136
5.	Conclusion	139
OBJECTIFS DE L'ETUDE.....		140
RESULTATS EXPERIMENTAUX.....		143
Article 1. Fragrance mixture encapsulation into poly-ε-caprolactone nanoparticles : optimization of the nanoprecipitation process		145
Article 2. Eugenol loaded solid lipid nanoparticles: comparative processes.....		165
Article 3. Hot homogenization process optimization for fragrance encapsulation in solid lipid nanoparticles.		165
Article 4. Degradable nanoparticles: suitable vectors for the transport of actives through the skin.....		219
Article 5. Encapsulation of hydrophobic allergens into nanoparticles improves the <i>in vitro</i> immunological diagnosis of allergic contact dermatitis		242
DISCUSSION - PERSPECTIVES		269
REFERENCES		295

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé en collaboration entre deux équipes à savoir le Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP) et l'unité INSERM U1111 du Centre International de Recherche en Infectiologie.

Je remercie Hatem Fessi pour m'avoir accueillie au sein du LAGEP afin de mener ce projet de Recherche. A ce titre, je tiens également à remercier chaleureusement le Professeur Stéphanie Briançon pour m'avoir soutenue tout au long de ces années, pour son soutien, sa gentillesse, son investissement et pour m'avoir accordée sa confiance pour conduire ce doctorat. Travailler à ses côtés a été une réelle fierté et un plaisir quotidien. Mes remerciements les plus sincères s'adressent également au Professeur Jean-François Nicolas pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche, personne que j'estime énormément pour son immense savoir scientifique et sa bonne humeur communicative. Je présente également un grand merci au Docteur Marc Vocanson pour m'avoir guidée tout au long de ce projet en me prodiguant de précieux conseils sur la vision de la Recherche, pour sa bonne humeur, et pour son investissement au cours de ce projet.

D'autre part, je remercie les Professeurs Gilberte Marti-Mestres, Marie-Christine Andry et Marc Pallardy qui ont accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse. Mes remerciements s'adressent également au Docteur Brigitte Illel et au Docteur Fabrice Battais pour avoir accepté de juger ce travail.

Je voulais également adresser mes sincères salutations à toutes les personnes que j'ai eu le plaisir de connaître au cours de ces années au sein de ces deux équipes, j'ai considéré ces deux laboratoires comme mes deux maisons y passant plus de temps que dans mon appartement et ces deux équipes m'ont soutenue comme une famille. Merci à Audrey, Aurélie, Barthélémy, Cécile, Céline, Déborah, Delphine, Emmanuelle, Eyad, Fabrice, Floriane, Géraldine, Gaël, Jocelyne, Karen, Léo, Marine, Mathilde, Morgan, Olivier, Patrick(s), Pauline, Pete, Raphaël, Tugba, Vanina, (et tous ceux que j'oublie).

Je remercie aussi Jean-Pierre et Sébastien pour leurs nombreux cours de bricolage et Nadia pour sa gentillesse et son soutien. J'adresse un merci particulier à Virginie pour m'avoir formée et supportée au cours de ces années et je n'oublierai pas mes deux miss : Jessica et Laure, qui m'ont soutenue et épaulée jusqu'au bout, une belle rencontre dans cette thèse. J'adresse également mes remerciements à Martine, ma petite maman de l'INSERM, merci pour ta générosité et ton soutien.

Toute ma gratitude va à mes parents, à ma sœur & Michel, sans vous, je ne serais pas là aujourd'hui, vous avez cru en moi et m'avez épaulée pendant ces années. Cette thèse est pour vous. Je remercie également Bab pour sa relecture et ses nombreux conseils.

Enfin je remercie Noé pour sa compréhension et pour m'avoir écoutée, encouragée, consolée et supportée... Voilà cette page se tourne.

Principales abréviations

% recovery : Rendement de réaction	FITR: <i>Fourier Transform InfraRed spectroscopy</i>
A: Alpha-amylcinnamaldéhyde	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
ACD: <i>Allergic contact dermatitis</i>	FMI: <i>Fragrance Mix I</i> Mélange de parfum
ADN : Acide désoxyribonucléique	G: Géraniol
APC : <i>Antigen Presenting Cells</i> Cellules Présentatrices d'Antigènes	GC: <i>Gaz chromatography</i> Chromatographie en phase gazeuse
ARE : Antioxydative Response Element	H: Hydroxycitronellal
ARN : Acide ribonucléique	HES: Hématéine-Eosine-Safran
ATP: Adénosine Triphosphate	HICC: Hydroxyisohexyl-3-cyclohexene carboxaldehyde
BMV : Bétaméthasone 17-valérate	HLA : <i>Human Leukocyte Antigen</i> Antigènes des leucocytes humains
BSE: Batterie standard européenne	HLB : <i>Hydrophilic lipophilic balance</i> Equilibre hydrophile- lipophile
C: Cinnamaldéhyde	HLBr : <i>required Hydrophilic lipophilic balance</i> Equilibre hydrophile- lipophile requis
CA: <i>Cinnamyl Alcohol</i> Alcool Cinnamique	HPH : <i>High Pressure Homogenization</i> Homogénéisation Haute Pression
CAS : <i>Chemical Abstract Service</i> Répertoire des molécules chimiques	HPLC: High Performance Liquid Chromatography Chromatographie en phase Liquide Haute Performance
CD : <i>Cluster of differentiation</i> Cluster de Différentiation	HPMC : Hydroxypropylmethylcellulose
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	HSR: Hypersensibilité Retardée
CSSS: <i>Cyanoacrylate Skin Surface Stripping</i> Séparation du <i>stratum corneum</i> par colle de Cyanoacrylate	I: Isoeugénol
D: Derme	ICDRG: <i>International Contact Dermatitis Research Group</i> Groupe international de recherche sur l'allergie de contact
DAMP: <i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>	IDEA : <i>International Dialogue for the Evaluation of Allergens</i> Table Ronde sur l'évaluation des allergènes
DC: Dendritic cell <i>Cellule Dendritique</i>	IDEC : <i>Inflammatory Dendritic Epidermal Cells</i> Cellules dendritiques épidermiques inflammatoires
dDC : <i>dermal Dendritic Cell</i> Cellule Dendritique dermique	IFN: Interféron
DNCB : 2,4-Dinitrochlorobenzene	IFRA : <i>International Fragrance Association</i> Association Internationale des Parfumeurs
DNFB: 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène	IL: Interleukine
E: Epiderme	INCI : <i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>
E: Eugénol	iNOS : <i>inductible Nitric oxide synthases</i>
EAC : Eczéma allergique de contact	IR : <i>Infrared</i> Infra- Rouge
EC : Ethylcellulose	ISO : <i>International Organization for Standardization</i> Organisation internationale de normalisation
EE%: <i>Efficiency Encapsulation percentage</i> Taux d'encapsulation	LC: <i>Langerhans cells</i> Cellules de Langerhans
EECDRG : <i>European Environmental and Contact Dermatitis Research Group</i> Groupe Européen de Recherche sur les Dermatites de Contact	LNC : <i>Lipid nanocapsule</i> Nanocapsule lipidique
ELISA: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> Dosage d'immuno-adsorption par enzyme liée	Log P : coefficient de partage
ELISPOT : <i>Enzyme-Linked Immunospot</i> Dosage d'immuno-spots par enzyme liée	
ES: Emulsion –Sonication	
ESB: <i>European Standard Battery</i> Batterie standard européenne	
FID: <i>Flame Ionization Detector</i> Détecteur à Ionisation de Flamme	

LT : Lymphocyte T
 LTT : *Lymphocyte Transformation Test* Test de Transformation lymphocytaires
 mAb: *monoclonal Antibody* Anticorps monoclonal
 mo-Mac : *monocyte derived Macrophages* macrophages dérivés de monocytes
 MRP : *Multidrug Resistant-associated Protein*
 NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
 NLC : *Nanostructured Lipid Carrier* Vecteurs lipidiques structurés
 NLR : *Noll like Receptor* Récepteur de type Noll
 NMF : *Natural Moisturizing Factors* Facteurs Naturels d'Hydratation
 NP : Nanoparticule
 NRF2 ou NFE2L2 : *Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-like 2*
 O: *Oak-Moss* Mousse de chêne
 OCDE: Organisation de Coopération et de Développement Economique
 OVA : Ovalbumine
 PA : Principe Actif
 PAMP: *Pathogen Associated Molecular Patterns* Motifs moléculaires associés à des pathogènes
 PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells* Cellules Mononuclées du Sang Périphérique
 PBS : *Phosphate buffer saline* Tampon phosphate
 PC : Prednicarbate
 PCL: poly-(ε-caprolactone)
 PD : Prednisolime
 pDC : *plasmacytoid Dendritic Cell* Cellules Dendritiques plasmacytoïde
 PEG : Polyéthylène glycol
 PGA : *Poly-(glycolic) acid* Acide poly-glycolique
 PLA : *Poly-(lactic) acid* Acide poly-lactique
 PLGA : *Poly-(lactic -glycolic) acid* copolymère d'acide lactique et glycolique
 pPD : *para*-Phenylenediamine
 PRR : *Pattern Recognition Receptor* Récepteurs du soi
 PV(OH): Poly-(vinyl alcohol)
 Q abs : Quantité absorbée
 RANTES : *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*

RC: *Receptor Cell* Compartiment récepteur
 RESS: *Rapid Expansion of Supercritical Solutions*
 ROAT : *Repeated Open Application Test* Tests Ouverts à Applications Répétées
 ROI : *Reactive oxygen intermediates* Espèces réactives oxygénés
 ROS : *Reactive oxygen species* Espèces Réactives à l'Oxygène
 Rpm: Rotation par minutes
 RPMIc: complete RPMI medium
 SC : *Stratum corneum* Couche cornée
 SCCNFP : *Scientific Committee on Cosmetic and Non-Food Products* Comité Scientifique des Cosmétiques et des Produits Non Alimentaires
 SCCS: *Scientific Committee on Consumer Safety* Comité scientifique de protection des consommateurs
 SEM: *Scanning Electron Microscopy* Microscopie Electronique à Balayage
 SI: *Stimulation Indice* Index de Stimulation
 si-RNA : *Small Interfering Ribonucleic Acid* Acide ribonucléique interférents
 SLN : *Solid Lipid Nanoparticle* Nanoparticule lipidique solide
 SMAC : *Supramolecular activation cluster* cluster d'activation supramoléculaire
 SS : *Skin Surface* Surface Cutanée
 TCR : *T Cell antigen Receptor* Récepteur antigénique T
 Teff: T effecteurs
 TGF : *Transforming Growth Factor* Facteur de croissance de Transformation
 THF: *Terminal Hair Follicle* Follicule Pileux Terminal
 TipDC : *TNF –iNOs producing Dendritic Cells* cellules dendritiques produisant TNF-iNOS
 TLR : *Toll like Receptor* Récepteur de type Toll
 TNCB: 2,4,6- trinitrochlorobenzene
 TNF: *Tumor Necrosis Factor* Facteur de nécrose tumorle
 UA: *Unit area* Unité d'Aire
 UE : Union Européenne
 UV : Ultra - Violet
 VHF: *Velus Hair Follicle* Follicule Pileux Velus

Introduction

Les nanotechnologies et plus spécifiquement le développement de nanoparticules ont connu une expansion fulgurante depuis une vingtaine d'années. En nanomédecine, ces outils sont actuellement de plus en plus utilisés pour améliorer les protocoles thérapeutiques ou les méthodes de diagnostic. Ainsi, certaines nanoparticules métalliques sont utilisées en tant que traceurs pour améliorer les contrastes d'images et l'observation / détection de certaines tumeurs. Très récemment, des nanoparticules d'oxyde d'hafnium ont été utilisées comme agent théranostique pour booster l'effet des rayons X émis lors de protocoles de radiothérapie. En outre, leur spécificité inhérente à leur morphologie et à leur taille, leur permet de franchir les principales barrières physiologiques et de pénétrer à l'intérieur des cellules, et de se positionner comme des vecteurs adaptés pour le transport de médicaments ou autres actifs à travers l'organisme.

En dermatologie, si pendant longtemps l'emploi des NPs s'est limité à l'ajout de nanoparticules de dioxyde de titane ou d'oxyde de zinc dans les crèmes solaires. Aujourd'hui, celles-ci sont devenues des outils majeurs d'innovation majeure pour les sociétés pharmaceutiques ou de dermo-cosmétiques qui développent des nouveaux traitements contre certaines pathologies cutanées (cancers, dermatoses inflammatoires, maladies infectieuses...). Ainsi, de nombreux travaux décrivent tout l'intérêt des nano-vecteurs pour la délivrance d'actifs à travers la peau. De même, il existe un véritable engouement pour le développement de nanoparticules organiques biodégradables, qui pallient les problèmes de toxicité liés à l'utilisation de nanoparticules métalliques.

Cependant, bien que les champs d'application des nanoparticules organiques en dermatologie paraissent exponentiels, un certain nombre de questions et de challenges technologiques restent en suspens pour atteindre les améliorations escomptées. En ce qui concerne les nano-vecteurs, le principal enjeu réside dans la conception de nanoparticules capables de protéger et d'augmenter la solubilité de molécules (xénobiotiques ou autres préparations vaccinales) tout en permettant un adressage ciblé et maîtrisé de l'actif encapsulé. Ces stratégies viseront à améliorer significativement les protocoles thérapeutiques en s'affranchissant de nombreux problèmes de toxicité lié au surdosage et à l'accumulation de principes actifs (et des nanoparticules) dans des cellules / tissus non ciblés. En outre, avec le développement futur de programmes de polythérapie (traitement médicamenteux comprenant plusieurs médicaments différents), il conviendra de maîtriser parfaitement les sites et la cinétique de libération de chacun des différents composés. Or à ce jour, très peu d'études ont cherché à modéliser la vectorisation simultanée de plusieurs

molécules à travers la peau. Enfin, un challenge consistera toujours à développer des applications originales de ces systèmes colloïdaux, comme de mettre à profit leurs propriétés de dispersion, qui leur permettent d'augmenter grandement la solubilisation de xénobiotiques de natures différentes dans les milieux de culture conventionnels. Ceci ouvrira sans aucun doute la porte à une meilleure évaluation et / ou criblage de ces composés dans les tests cellulaires *in vitro*.

A travers ce travail de thèse, nous avons cherché à relever certains des challenges ou adresser certaines des questions mentionnées ci-dessus, et nous avons ainsi développé / optimisé plusieurs procédés pour obtenir de nouvelles nanoparticules organiques encapsulant un mélange modèle de substances odorantes. Ces nouveaux outils ont ensuite été éprouvés dans un modèle *ex-vivo* de pénétration cutanée, afin d'étudier les paramètres qui dictent l'adressage des composés du mélange à travers la peau. De plus, nous avons capitalisé sur le développement de ces systèmes pour démontrer la faisabilité d'un nouveau test de diagnostic *in vitro* de l'allergie aux parfums. La prévalence de ce type d'allergie étant en augmentation ces dernières années, il est donc important de disposer d'outils de diagnostic efficaces pour cribler avec précision les nombreux composés allergisants qui composent un parfum. À ce jour, la méthode de diagnostic standard de l'allergie aux parfums est essentiellement clinique, ce qui pose un certain nombre de problèmes pour le patient (processus de diagnostic long, parfois peu fiable, risque de sensibilisation active...). Les nano-objets développés ici nous ont aidés à lever un verrou technologique lié à l'impossibilité de solubiliser de façon efficace les nombreux composés hydrophobes constituant un parfum, dans les milieux de culture conventionnels.

Avant de présenter les résultats obtenus au cours de cette thèse, un état des connaissances actuelles sera tout d'abord dressé concernant : i) le développement et la caractérisation des nanoparticules dans le domaine biomédical, ii) les techniques existantes pour encapsuler des mélanges de molécules (et notamment des substances odorantes), iii) l'évaluation des nano-vecteurs en tant que promoteur de l'absorption cutanée et enfin iv) l'eczéma allergique de contact aux parfums. Cette étude bibliographique sera complétée par les résultats personnels obtenus concernant : i) la préparation de nanoparticules polymères encapsulant un mélange de substances odorantes ; ii) la comparaison de deux procédés pour l'encapsulation de l'eugénol, une des molécules modèles odorantes, dans des nanoparticules lipidiques ; iii) L'utilisation du procédé d'homogénéisation haute pression pour la préparation de nanoparticules lipidiques encapsulant le mélange de molécules odorantes ; iv) la pénétration cutanée de ces nanoparticules dans la peau ; et v) l'application de ces nanoparticules dans un test de diagnostic *in vitro* de l'allergie de contact aux parfums.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Nanoparticules, outils d'innovation dans le domaine biomédical

Les nanomatériaux et plus généralement les nanotechnologies recouvrent un domaine en plein essor depuis une vingtaine d'années qui devrait jouer un rôle très important dans l'économie du XXI^e siècle. L'intérêt majeur de ces nano-objets repose sur les propriétés inhérentes à leur morphologie et à leur taille. En effet, la réduction de la taille de diverses structures en deçà du micromètre a permis de mettre en évidence de nouvelles propriétés non observées à des tailles plus conventionnelles. Ainsi, ces nanomatériaux sont retrouvés dans de nombreux secteurs tels que l'électronique, l'informatique, la téléphonie mobile, le sport, les textiles, le bâtiment, l'automobile, mais également l'alimentation, la santé et les produits cosmétiques. Les nanomatériaux promettent des avantages significatifs dans ces différents domaines, notamment en médecine au niveau du diagnostic et du traitement. Ils permettent également l'obtention de meilleurs rendements énergétiques, de matériaux plus légers, plus solides et à meilleur marché, de produits électroniques plus rapides et plus puissants. Ils sont également efficaces dans le traitement de l'eau (Afsset, 2010).

1. Définition du terme : « nanoparticule »

1.1. Norme ISO TS/27687

Une nanoparticule est définie par la norme ISO TS/27687 comme étant un nano-objet dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire une particule dont le diamètre nominal est inférieur à 100 nm environ. Une autre définition, plus large, qualifie de « nanoparticule » un assemblage d'atomes dont au moins une des dimensions se situe à l'échelle nanométrique (ISO, 2008).

1.2. Définition de l'Union Européenne 2011/696/UE

Un nanomatériau est un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50% des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm. Dans des cas spécifiques, lorsque cela se justifie pour des raisons tenant à la protection de l'environnement, à la santé publique, à la sécurité ou à la compétitivité, le seuil de 50 % fixé pour la répartition numérique par taille peut être remplacé par un seuil compris entre 1 % et 50 % (Union Européenne, 2011).

1.3. Définition du Règlement cosmétique européen

Les nanoparticules sont des matériaux insolubles ou bio-persistants fabriqués intentionnellement et se caractérisant par une ou plusieurs dimensions, ou une structure interne, sur une échelle de 1 à 100 nm (Règlement européen, 2013).

Il n'existe donc pas une seule définition réglementaire du terme « nanoparticule ». Les particules étudiées au cours de ces travaux possèdent une taille supérieure à 100 nm, elles sont qualifiées de particules submicroniques. Néanmoins, dans le domaine scientifique, ces particules sont également appelées « nanoparticules ».

Les particules submicroniques possèdent une taille comprise entre 100 nm et 1 μ m. Dans le vivant ces structures se situent donc entre l'échelle du virus (\approx 100 nm) et l'échelle de la bactérie (\approx 1 μ m) (Figure 1).

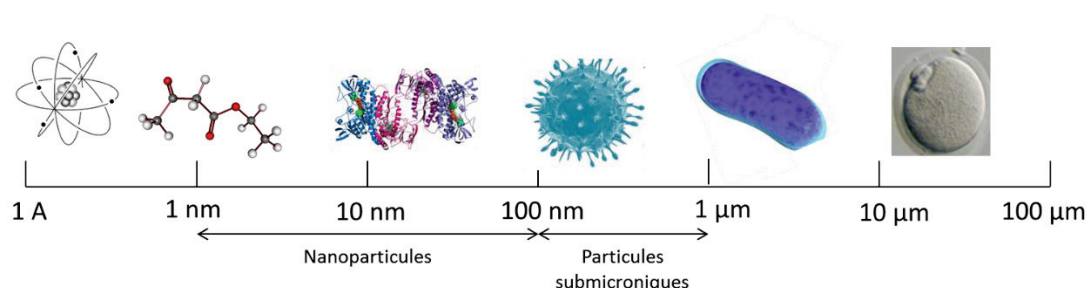


Figure 1: Comparaison de la taille des nanoparticules à celle des principales structures chimiques et biologiques

Leur faible taille leur confère une grande surface spécifique, assurant leur stabilité. En effet, les nanoparticules (NPs) peuvent former des suspensions homogènes, sans phénomène de sédimentation ou de crémage. De plus, le passage de principes actifs (molécules chimiques, médiateurs, métabolites...) à l'intérieur des cellules se fait par l'action de pores de taille nanométrique. Ainsi, les NPs peuvent aisément franchir les membranes biologiques facilitant ainsi le transport d'actifs jusqu'à leur cible. Leur utilisation dans le domaine médical a ouvert un nouveau secteur de recherche nommé : « new drug delivery ».

2. Développement de nanoparticules et « drug delivery »

Dans le domaine de la Santé, les NPs sont utilisées en tant que vecteurs de principes actifs pour le traitement de pathologies, ou comme marqueurs pour le diagnostic en imagerie tissulaire. Ces nano-objets peuvent ainsi apporter d'une manière spécifique les substances actives dans les tissus à traiter en évitant les effets indésirables du principe actif (PA) sur le reste de l'organisme et en favorisant les passages transmembranaires et / ou intracellulaires (AFSSAPS, 2011).

2.1. Les différents types de nanoparticules

La définition de nanoparticules, donnée précédemment, intègre seulement une notion de taille et non pas de type de matériau ; cependant, il existe un grand nombre de structures. Ces vecteurs peuvent néanmoins être regroupés en deux grandes familles : les NPs dégradables qui n'entraînent pas de risques d'accumulation dans les tissus et les NPs non dégradables qui présentent souvent des propriétés optiques pour l'imagerie médicale.

2.1.1. Nanoparticules non dégradables

Ces NPs ont été développées pour obtenir de nouvelles propriétés découlant de leur taille. Elles possèdent un large champ d'application. Cette catégorie regroupe des NPs rigides possédant des formes variées comme des sphères, des ellipsoïdes, des aiguilles, des tubes.... Ce type de NP est biocompatible mais non biodégradable.

2.1.1.1. Les fullerènes

Ces structures carbonées ont été découvertes en 1985 par Harold Kroto, Robert Curl et Richard Smalley (Kroto, 1985) en vaporisant du graphite par laser dans une enceinte d'hélium et en mesurant le spectre de masse du carbone. Les objets prennent la forme d'une sphère, d'un ellipsoïde, d'un nanotube ou encore d'un anneau. Ils comportent 60 à 70 atomes agencés en pentagones et en hexagones, et présentent une grande stabilité (Figure 2). Les fullerènes étant des assemblages atomiques creux, peuvent y être introduits des atomes étrangers, notamment métalliques (La, Ni, Na, K, Rb, Cs) utilisés pour l'imagerie médicale ou des principes actifs essentiels au niveau thérapeutique. Les molécules de fullerène peuvent aussi s'arranger selon un réseau cristallin pour former des nanotubes. Ils sont peu solubles dans l'eau ($1,3 \times 10^{-11}$ mg.mL⁻¹) (Bouchard, 2008) et forment des suspensions colloïdales (Farré, 2010).

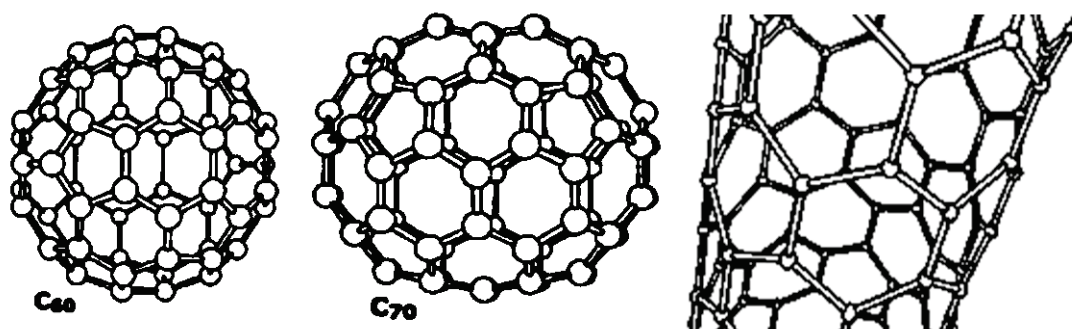


Figure 2 : Représentation des fullerènes C₆₀, C₇₀, et un nanotube de carbone (Ostiguy, 2010)

2.1.1.2. Les nanoparticules métalliques

Une grande partie des métaux possèdent des propriétés spécifiques à l'échelle nanométrique, des NPs d'or, d'argent, de silice, de fer.... sont ainsi développées. Les NPs d'or sont particulièrement étudiées en tant que marqueurs optiques. En effet, elles présentent un spectre de résonance dans le visible sensible aux conditions expérimentales, à la taille et à la forme de la NPs (Liu, 2007 ; Parak, 2003). Les NPs magnétiques sont le plus souvent réalisées à partir d'oxydes de fer super-paramagnétiques (Cheon, 2008). De plus, les oxydes de zinc et de titane sont principalement utilisés dans les crèmes solaires en tant que filtres solaires (Afsset, 2008).

2.1.1.3. Les puits quantiques

Ces structures d'appellation anglophone « quantum dots », ont été découvertes en 1980 par Louis E Brus (Ostiguy, 2010). Ils sont composés de combinaison d'éléments des groupes II et IV ou des groupes III et V du tableau périodique de Mendeleïev. Le plus souvent, les associations suivantes sont retrouvées : cadmium / sélénium, cadmium / tellure, indium / arsenic ou indium / phosphore. Le nombre d'atomes des puits quantiques peut varier de 1 000 à 100 000 et leur association présente des dimensions plus petites que le rayon de Bohr (mesurant entre 2 et 10 nm de diamètre). Ils démontrent ainsi des propriétés optiques et électroniques dues à leur confinement quantique, ils peuvent, par exemple, absorber la lumière blanche ou ultraviolette et la réémettre à une longueur d'onde spécifique en quelques nanosecondes (Aitken, 2004). La flexibilité des puits quantiques et les propriétés optiques associées permettent d'envisager des applications dans le domaine médical. Ils sont notamment mis en œuvre lors de marquage biologique en tant que sondes cellulaires, les cellules sont marquées par des quantum dots, réinjectées au patient et suivies en microscopie. Des marquages multi-couleurs sont possibles avec de telles structures. Leur important rapport surface / volume offre la possibilité de les conjuguer à des anticorps, à des protéines et à des oligonucléotides. Ils sont également modifiées afin de vectoriser des médicaments et des outils de diagnostic (Michalet, 2005). Néanmoins, un inconvénient majeur reste leur toxicité *in vivo*.

2.1.2. Nanoparticules dégradables

Ces NPs sont généralement composées de lipides, de sucres, ou de polymères dégradables et peuvent être dispersées dans des solutions aqueuses, des crèmes ou d'autres types de formulations. Les particules dispersées peuvent être solides, fluides ou dans un état de gel, rigides ou déformables. En fonction du type de matériau utilisé et du pH, les NPs peuvent être chargées en surface. Cette caractéristique est très importante ; en effet, elle permet de s'affranchir des phénomènes d'agréation, les particules chargées se

repoussant. De plus, leurs tailles sont très variées s'étendant de quelques dizaines à mille nanomètres.

2.1.2.1. Les nanoparticules polymériques

En 1979, Couvreur *et al.* mettent au point les premières NPs polymères à base de poly-(alkyl-cyanoacrylates) (Couvreur, 1979). Depuis les recherches autour de ces structures n'ont cessé de se développer et de nouveaux polymères ont été utilisés comme notamment, les poly-(acide lactique) (PLA), le poly-(acide glycolique) (PGA) et leur copolymère le poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) présentant de nombreuses masses moléculaires mais également des copolymères basés sur des polypeptides ou des polynucléotides (Kumar, 2006). Ces polymères sont biocompatibles et biodégradables et leur utilisation dans le secteur de la Santé est autorisée par les autorités mondiales comme la Food and Drug Administration et par la Pharmacopée Européenne (Truchon, 2008). Leur dégradation n'entraîne pas la formation de métabolites toxiques pour l'organisme (Chernenko, 2009 ; Nanaki, 2011) et leur grande stabilité leur confère des caractéristiques essentielles pour leur emploi dans le domaine biomédical. Les NPs polymères possèdent généralement une forme sphérique et sont rigides. Il en existe deux types à savoir les nanosphères et les nanocapsules. Au sein des nanosphères, le PA est dispersé dans l'intégralité de la structure, tandis qu'au sein des nanocapsules, le PA est dans un vecteur liquide, le plus souvent une huile, se trouvant au centre de la structure (Figure 3) (Koo, 2005).

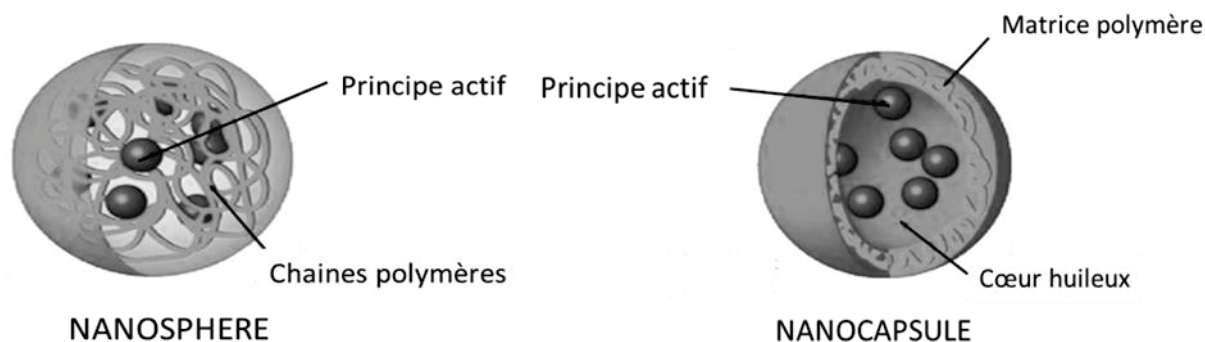


Figure 3: Représentation des nanosphères et des nanocapsules

Malgré tous ces avantages, leur utilisation reste encore faible. En effet, leur procédé de synthèse faisant appel à l'utilisation de solvants organiques, des problèmes de cytotoxicité sont parfois observés (Smith, 1998) et les méthodes d'obtention sont souvent difficilement industrialisables et aboutissent souvent à des suspensions colloïdales de faibles concentrations ($\approx 2\%$).

2.1.2.1.1. Les dendrimères

Mise au point en 1979 par Tomalia *et al.* (Tomalia, 1985), les dendrimères adoptent une forme dite « d'arbres » et sont obtenus par l'assemblage de monomères, nécessitant de nombreuses étapes de synthèse (Figure 4). Leurs propriétés varient donc en fonction des monomères employés. Ils peuvent arborer des zones hydrophobes ou hydrophiles, chargées ou non, en fonction des caractéristiques souhaitées. La présence par exemple de groupes carboxyliques leur apporte un caractère hydrophile. Leur taille est généralement comprise entre 1 et 100 nm. Ils possèdent donc une structure contrôlée atome par atome, mais le procédé de synthèse s'avère complexe et délicat (Boas, 2004).

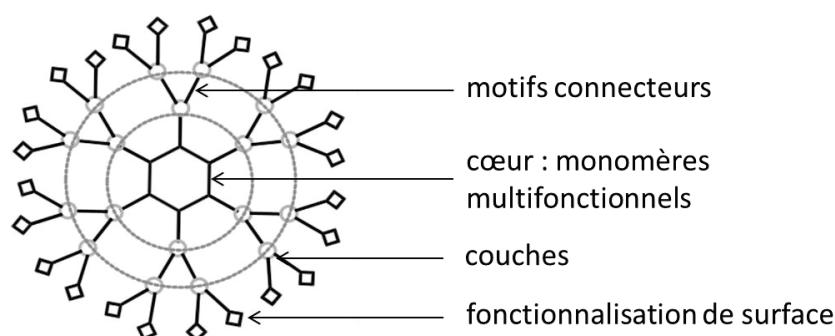


Figure 4: Représentation schématique de la structure dendritique (Perez-Anes, 2010)

2.1.2.2. Les nanoparticules lipidiques

2.1.2.2.1. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules formées de bicouches lipidiques concentriques, constituant une zone hydrophobe propre à la vectorisation de molécules hydrophobes et présentant un cœur hydrophile spécifique à la vectorisation de molécules hydrophiles (Mozafari, 2008) (Figure 5). Le plus souvent, ils sont à base de phospholipides et de molécules de cholestérol, et possèdent une taille de 30 nm à plusieurs micromètres. Dans le domaine biomédical, ces structures déformables sont des transporteurs de principes actifs thérapeutiques ou d'agents d'imagerie présentant une forte biocompatibilité (Gregoriadis, 1976). La quantité de cholestérol présent est étroitement liée à la rigidité de la structure. Ces particules sont depuis de nombreuses années utilisées comme outils pour la biologie, la biochimie et la médecine en tant que transporteurs de principes actifs thérapeutiques ou d'agents d'imagerie. Leur caractère non toxique et biocompatible fait de ces colloïdes des systèmes intéressants pour les applications *in vivo*. Néanmoins, leur utilisation est gouvernée par quelques limitations incluant une stabilité modérée, une faible capacité d'encapsulation, et une libération précoce des principes actifs (Pinto-Alphandary, 2000). Ainsi, une nouvelle génération de liposomes a été développée afin de pallier ces

désavantages. Ils portent le nom de niosomes, éthosomes et polymersomes... Les niosomes sont préparés à partir d'un mélange de tensioactifs non ioniques et de cholestérol ; parfois une faible quantité de phospholipides est ajoutée (Mukherjee, 2007). Cet ajout permet d'augmenter par rapport aux liposomes plus classiques. Les éthosomes présentent une plus grande élasticité des vésicules due à la présence de 20 à 45 % d'éthanol. Ce type de particule est généralement anionique et leur membrane lipidique est fluide (Mbah, 2014). Les polymersomes sont composés de copolymères blocs, comportant des zones hydrophiles et hydrophobes, au cœur aqueux (Zhao, 2014).

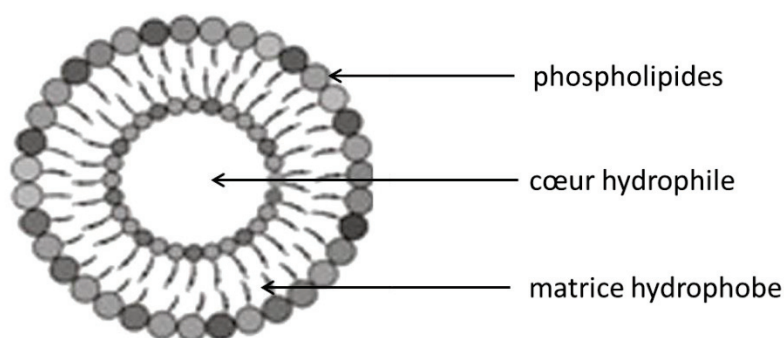


Figure 5 : Représentation schématique de la structure des liposomes

2.1.2.2.2. Les nanoparticules lipidiques solides

Ce type de NPs a été introduit dans les années 90, pour proposer une alternative à l'utilisation de nano-émulsions (Magenheim, 1993 ; Benita, 1986a, 1986b). Elles se placent aujourd'hui comme des vecteurs d'intérêt permettant de pallier les problèmes liés aux autres formes nanoparticulaires comme les liposomes, les NPs polymères.... inconvénients liés aux résidus de solvants organiques restant après la synthèse, aux problèmes de cytotoxicité, de production à grande échelle, ou encore de stabilité dans le temps. Elles sont constituées de lipides solides à températures ambiantes (le plus souvent à base de glycérides, d'acides ou d'esters gras) (Mehnert, 2001). Elles portent l'appellation anglophone de « Solid Lipid Nanoparticles » (SLNs) (Figure 6). Cette matrice lipidique, plus ou moins cristallisée, est stabilisée par une couche de tensioactifs (le plus souvent non ioniques). Les principales techniques d'obtention de ces structures sont réalisées en l'absence de solvants organiques. Dans cette catégorie de NPs, sont retrouvées également les nanocapsules lipidiques communément appelés Lipid Nanocapsules (LNCs) (Figure 7), à la différence des SLNs, ces dernières possèdent un cœur liquide entouré d'une coque solide. De telles structures présentent néanmoins des inconvénients : des phénomènes d'aggrégation peuvent être observés dans le temps, les systèmes ont tendance à gélifier spontanément, de manière imprévisible et pour les SLNs des transitions polymorphiques de lipides surviennent parfois (Müller, 1995).

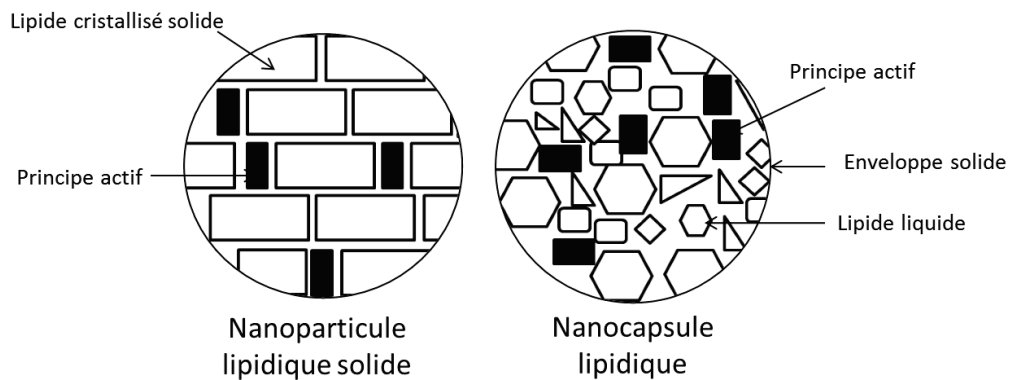


Figure 6 : Représentation schématique de la structure des liposomes (Pardeike, 2009)

2.2. Nanoparticules et enjeux thérapeutiques

Avec le développement de la Recherche autour des nanotechnologies, les avancées dans ce domaine se sont multipliées ainsi en quelques années, trois générations de nanoparticules ont vu le jour.

2.2.1. Première génération de nanoparticules

Ces vecteurs ont principalement été développés pour l'administration intraveineuse. L'objectif premier de leur utilisation dans le domaine médical résidait principalement dans leur capacité à éviter l'élimination précoce et l'excrétion par le système rénal après leur administration. En effet, les NPs de quelques nanomètres peuvent aisément passer par les pores rénaux. Néanmoins, dans le sang, les NPs sont reconnus comme « corps étrangers » par le système immunitaire et sont souvent pris en charge par les macrophages (Figure 7).

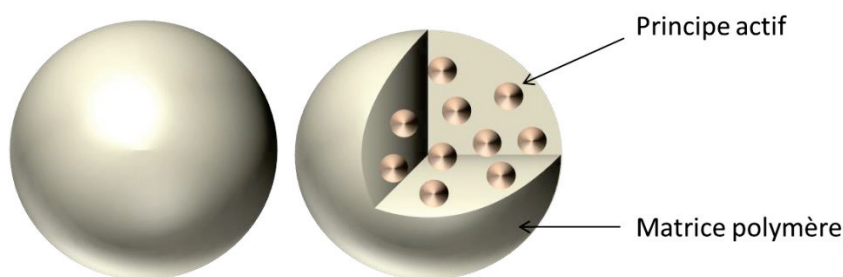


Figure 7: Représentation schématique d'une nanoparticule de première génération

2.2.2. Deuxième génération de nanoparticules dites « furtives »

Le but de ces vecteurs est de transporter le principe actif jusqu'à sa cible biologique et de prolonger sa durée de vie dans la circulation sanguine (Torchilin, 2006). L'encapsulation du PA permet une diminution de sa métabolisation et de son élimination par les mécanismes naturels, réduisant également les problèmes de toxicité. En effet, l'accumulation de molécules actives dans les organes d'élimination comme le foie, le rein, la rate... peut s'avérer toxique et entraîner des effets secondaires. Dans le sang, les NPs sont rapidement recouvertes d'opsonines reconnues par les macrophages du foie, de la rate, des poumons ou encore par les macrophages circulants. Les NPs sont recouvertes de polyéthylène glycol (PEG) rendant les particules plus hydrophiles et créant un encombrement stérique, permettant ainsi d'éviter le processus d'opsonisation. Elles sont ainsi rendues furtives (Figure 8). Néanmoins, ce procédé dépend fortement du type de NPs sur lequel le PEG est greffé. Le dextran est également utilisé pour augmenter la furtivité (Moghimi, 2001, 2003 ; Monfardini, 2003).

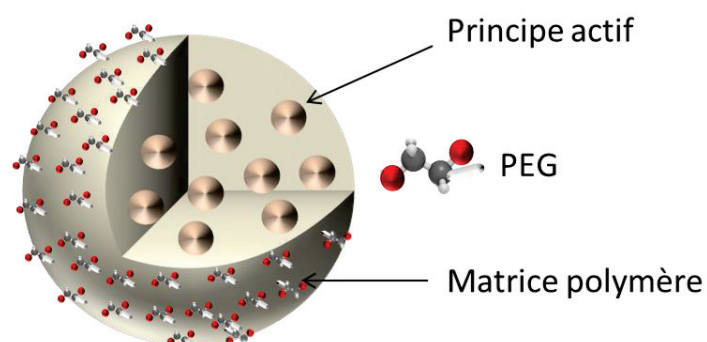


Figure 8 : Représentation schématique de la structure d'une nanoparticule « furtive » recouvert de PEG: NPs de deuxième génération

2.2.3. Troisième génération de nanoparticules dites « ciblantes »

Afin de garantir la délivrance du PA à sa cible biologique, la surface des NPs furtives a été fonctionnalisée par des ligands biologiques (anticorps, peptides, saccharides, oligonucléotides ou des molécules sécrétées par les cellules comme le folate). Afin de ne pas interagir avec les PEG, des bras « espaceurs » sont utilisés, garantissant également une plus grande liberté de mouvement (Figure 9) (Tada, 2007 ; Cai, 2006 ; Yang, 2008 ; Farokhzad, 2006 ; Zhang, 2007).

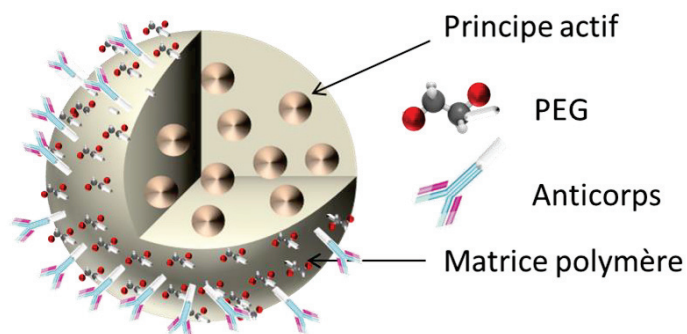


Figure 9 : Représentation schématique de la structure d'une nanoparticule « furtive » recouvert de PEG et de ligands greffés sur des bras « espaceurs » : NPs de troisième génération

Malgré ces stratégies, peu de spécialités sous forme de NPs présentent aujourd'hui une autorisation de mise sur le marché en France. De nombreuses autres structures de NPs visant la délivrance de médicaments sont actuellement en cours d'études précliniques et cliniques. Ce sont principalement des liposomes incorporant des molécules hydrophiles, ou des SLNs, de protéines ou de polymères biodégradables encapsulant des molécules lipophiles.

2.3. Nanoparticules, outils de diagnostic

Les NPs sont également mises au service du développement de produits de contraste pour augmenter la résolution des images médicales pénétrant aisément dans les cellules et notamment les cellules tumorales. Les seuils de spécificité et de sensibilité sont augmentés et permettent un diagnostic plus fiable et une prise en charge plus rapide de la maladie. La détection est alors réalisée par microscopie optique, microscopie électronique à transmission, ou par imagerie par résonance magnétique. (AFSSAPS 2010). De nombreux médicaments sont en cours de développement seul l'Endorem® et le Resovist® ont été commercialisés en France. Ces deux médicaments sont composés d'oxyde de fer.

2.4. Nanoparticules et théranostiques

Le concept des nanoparticules multifonctionnelles ou nanotheranostiques permet d'imaginer des NPs remplissant simultanément plusieurs fonctions thérapeutiques et diagnostiques (Figure 10) (Arias, 2001 ; Sempere, 2011). Elles comportent ainsi des agents de furtivité, de ciblage, de contraste et des substances actives. Des agents d'activation sont également retrouvés permettant la libération contrôlée du principe actif sous l'effet de stimuli extérieurs comme le pH, l'application d'ultrasons ou de chaleur dans la zone cible. Outre la délivrance de principes actifs, d'ADN ou d'ARN, les NPs sont utilisées dans le développement de nouvelles thérapies incluant la radiothérapie (Li, 2004), la thérapie (Ito, 2005 ; Wust, 2006) ou encore la thérapie photo-dynamique (Wilson, 2008 ; Kopelman, 2005).

Dans ces trois cas, les NPs sont les vecteurs d'agents thérapeutiques incluant des sources radioactives, matériau engendrant l'hyperthermie ou la photosensibilisation dans les zones souhaitées.

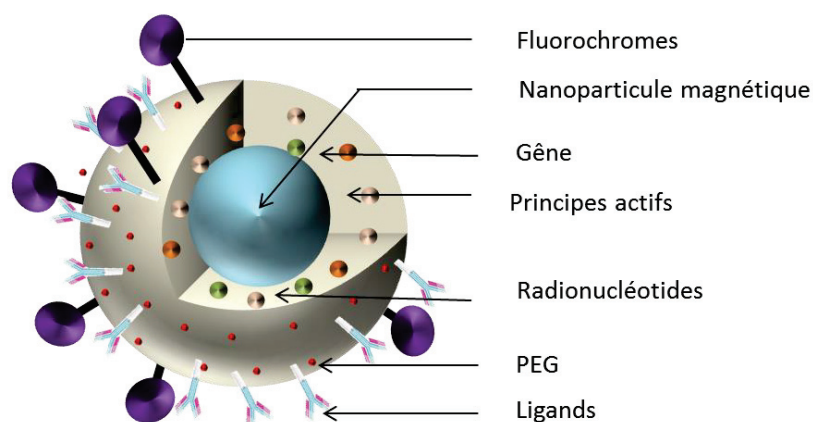


Figure 10 : Représentation schématique de nanoparticule multifonctionnelle transportant un ou plusieurs principes actifs, ainsi que des agents de contraste permettant le suivi après administration au patient. Les agents de ciblage employés classiquement sont des anticorps monoclonaux favorisant l'accumulation des nanoparticules dans les zones ciblées et / ou l'internalisation dans les cellules visées (Papakostas, 2011).

2.5. Toxicité des NPs

L'expansion rapide des nanotechnologies a encouragé les autorités sanitaires et la communauté scientifique à s'intéresser aux problèmes toxicologiques liés à leur utilisation. Ainsi une nouvelle sous-discipline de la toxicologie a été créée : « la nanotoxicologie ». Pour des formes plus conventionnelles, le profil toxicologique est souvent lié à la dose administrée. Dans le cas des NPs, cette corrélation n'est pas retrouvée. Généralement, la diminution de taille des particules induit une plus forte toxicité que les formes de tailles plus conventionnelles. La toxicologie des NPs est réalisée en étudiant la viabilité cellulaire, la réponse inflammatoire, le stress oxydant, ou encore les dommages induits à l'ADN (Afsset, 2008). De manière générale, il a été observé que les NPs présentent certains comportements similaires aux virus notamment au niveau des interactions avec les cellules (Oberdorster, 2007).

2.5.1. Influence de différents facteurs

Pour évaluer la toxicité des matériaux plus conventionnels, seules la nature chimique et la concentration massique sont prises en compte. Or, pour les NPs, ces paramètres ne sont pas suffisants, ils doivent être complétés par la prise en considération de beaucoup de facteurs comme la taille, la quantité, la structure, la surface spécifique, la réactivité de surface, les capacités d'agrégation, la présence de surfactants, de solvants et enfin la voie d'administration. Trois voies d'entrée sont principalement étudiées aujourd'hui *in vivo* et surtout *in vitro* : l'inhalation, l'ingestion et la pénétration transcutanée (Truchon, 2008 ; Nel, 2006 ; Magrez, 2006). De par leur faible taille, il est difficile d'observer les NPs directement dans les cellules ou dans les tissus. Les trois méthodes qui peuvent être utilisées sont la microscopie électronique à balayage, la microscopie électronique de transmission et la microscopie de force atomique.

2.5.1.1. Taille

La réduction de taille à l'échelle nanométrique augmente la surface spécifique, il y a donc plus de molécules chimiques pouvant réagir avec leur environnement et ainsi une augmentation des effets toxiques (Linkov, 2008 ; Hyuk Suh, 2009). Les NPs pourraient alors être absorbées par les tissus. Après administration, 33 % de NPs de 50 nm, 26 % de NPs de 100 nm, 10 % de NPs de 500 nm ont été retrouvées dans les muqueuses et les tissus lymphatiques de l'estomac. Il a ainsi été conclu que les NPs de taille inférieure à 100 nm étaient absorbées par les cellules de l'intestin contrairement aux molécules les plus larges et les particules de taille supérieure à 500 nm ne passant pas dans la circulation sanguine (Hyuk Suh, 2009). L'absorption des NPs de taille inférieure à 100 nm est augmentée dans les tissus lymphatiques comparée à celle dans les cellules intestinales (Ai, 2011). La taille se présente donc comme le facteur clé dans la prédiction du potentiel toxicologique des NPs. Il est important de s'intéresser à la taille mais également au phénomène d'agglomération touchant les NPs. Cette capacité favorise leur pénétration dans l'organisme (Preining, 1998 ; Powers, 2006). Un fois dans l'organisme, les NPs peuvent interagir avec des molécules présentes dans les milieux biologiques modifiant leur taille et leurs propriétés de surface (Powers, 2006). Sager *et al.* ont montré qu'il était difficile de transposer les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* ; en effet les caractéristiques des particules sont différentes, par exemple en solution les NPs ont tendance à s'agglomérer (Sager, 2007).

2.5.1.2. Surface des particules

Geiser *et al.* ont étudié les interactions entre la surface des particules et les cellules recouvrant les poumons. Ainsi en fonction de la nature de leur surface, les particules ne sont pas entièrement absorbées après exposition. Cette expérience montre que la présence d'un film de tensioactifs favoriserait l'absorption, réduisant les tensions de surface (Geiser, 2003). De plus, les groupes réactifs à la surface des NPs pourraient modifier les effets biologiques. La fonctionnalisation des NPs influence donc la cytotoxicité. Par exemple, les particules de silice recouvertes de quartz présentent une cytotoxicité, une inflammogénicité et une fibrogénicité plus faibles que des particules de silice non modifiées. Ces différences sont dues aux modifications des caractéristiques de surface. En effet, le caractère cytotoxique des NPs de silice au contact de cellules va générer des espèces radicalaires de type ROS entraînant le développement de fibroses et de cancers pulmonaires (Schins, 2002 ; Fubini, 1997). Les NPs de fer pourraient également produire ces espèces radicalaires nocives pour les cellules, cet effet est réduit lorsque ces dernières sont recouvertes d'une couche de pullulan (Singh, 2007 ; Clift Martin, 2008 ; Oberdo, 2010). D'autre part, le caractère hydrophile ou hydrophobe des NPs est également estimé pour prédire la toxicité des NPs. L'absorption des NPs produites avec des polymères hydrophobes est plus grande que celle produite avec des polymères hydrophiles (Ai, 2011). Plusieurs études s'intéressent sur les caractéristiques à utiliser pour évaluer le risque toxicologique des NPs (Kandlikar, 2007). Plusieurs auteurs présentent la surface spécifique comme l'approche privilégiée mais cette hypothèse reste controversée. Des études (Dick, 2003; Donaldson, 2002 ; Renwick, 2001; Oberdörster, 1996) soulignent qu'il n'est pas possible, actuellement, de quantifier spécifiquement le nombre et l'aire de surface d'une particule en particulier. La mesure de la masse en fonction de différentes tranches granulométriques de particules, pour une même espèce chimique, pourrait, selon certains auteurs, représenter une meilleure alternative pour l'évaluation du risque à la Santé associée à l'exposition (Afsset, 2006).

2.5.1.3. Dosage

La toxicité et les réponses obtenues dépendent du dosage (Teeguarden, 2007). Singh *et al.* ont étudié *in vitro* les effets de deux populations de particules de TiO₂ de tailles comprises entre 40 et 300 nm et entre 20 et 80 nm sur des cellules pulmonaires humaines (A549). Ces chercheurs ont montré qu'une grande dose de petites particules (20 et 80 nm) serait plus toxique qu'une plus faible dose de grosses particules (40 et 300 nm) (Singh, 2007). Selon les données disponibles, il n'est pas simple de relier les effets *in vitro* aux effets mesurés *in vivo*. En effet, le plus souvent les doses *in vitro* et *in vivo* ne sont pas équivalentes. Les NPs présentes dans un même milieu de culture peuvent diffuser ou

sédimenter à des vitesses différentes et affecter ainsi les doses cellulaires. Par exemple, à concentration équivalente (cm^2/mL), une NP d'argent de 15 nm serait 4000 fois plus efficace à induire des effets toxiques qu'une particule d'oxyde de cadmium dont le diamètre est de l'ordre du micron. Cependant, si l'on considère les quantités respectives de ces NPs ayant effectivement atteint les cellules, la particule d'argent n'est plus que 50 fois plus efficace à induire des effets toxiques que la particule d'oxyde de cadmium. Ainsi, il est important de quantifier les doses réelles de NPs au niveau des cellules cibles afin de valider les tests *in vitro* (Donaldson, 2008). La toxicité des NPs est donc difficile à déterminer et dépend de nombreuses variables. Schrurs *et al.* ont analysé 38 publications scientifiques portant sur les nano-silices et comparé les différents résultats obtenus. Ils montrent ainsi qu'il est impossible de trouver des corrélations ; les méthodes, les matériaux et les vocabulaires utilisés étant très différents. Une évaluation du risque est donc impossible pour l'instant. Il est donc essentiel de dresser des règles et des standards à l'échelle mondiale (Schrurs, 2012).

3. Utilisation des micro / nanoparticules en dermatologie

De nombreuses formes de NPs ont été développées pour leur application dans le traitement ou la prévention de pathologies cutanées. Les liposomes ont été très utilisés notamment dans le domaine de la photoprotection, pour le traitement des désordres capillaires ou encore pour le ciblage de la glande sébacée. De plus, les particules de dioxydes de titane et de zinc sont des filtres solaires retrouvés dans de nombreux produits cosmétiques (AFSSAPS, 2010). Les fullerènes présenteraient également cette capacité (Chirico, 2007). Les puits quantiques associés à l'oxyde de titane permettraient d'augmenter leur pouvoir de photoprotection (Mortensen, 2008). De plus, le développement des particules polymères pour la voie cutanée a été envisagé notamment pour le transport d'antigène, ou comme agents adjuvants pour la vaccination par voie cutanée (Tableau 1) (Papakostas, 2011).

Tableau 1 : Application de NPs par la voie cutanée

Champs d'application	Types de NPs	Principes actifs encapsulés	Taille (nm)	Résultats	Références
Photoprotection	TiO ₂ , ZnO	-	30-150	-Agrégation des particules ; très bons filtres UV comparés aux molécules organiques (benzophénones). -Pénétration dans le <i>stratum corneum</i> . -Temps d'élimination égal aux molécules organiques.	(Schilling, 2010)
Crèmes protectrices	NPs de silice et de <i>Hippospongia communis</i>	Antioxydants (thé vert, extrait de <i>Pongamia pinnata</i> , extrait d' <i>Angelica</i>)	>1000	- Les microparticules dispersées dans une crème protectrice garantissent une meilleure distribution des antioxydants à la surface de la peau. - Formation d'un film protecteur dans le SC.	(Lademann, 2008)
	NPs de silice	Lipides	>1000	- Utilisation des microparticules dans une crème nourrissante en cas d'eczéma. -Meilleure protection immédiate contre la perte insensible en eau comparée à une crème classique (huile de silicone).	(de Fine Olivarius, 1996)

Crèmes antiseptiques	TiO ₂	-	Non décrite	<ul style="list-style-type: none"> - Etudes de plusieurs souches de bactéries : <i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Enterococcus hirae</i> and <i>Bacteroides fragilis</i>. - Effet bactériostatique du TiO₂. 	(Tsuang, 2008)
Thérapies Photothermiques	NPs d'or	-	Non décrite	<ul style="list-style-type: none"> - Traitement des carcinomes par application topique des particules après irradiation infrarouge (hyperthermie cellulaire). Inhibition de la croissance de la tumeur après 13 jours et 57 % de résorption après traitement topique contre 25 % après administration intravasculaire. 	(Dickerson, 2008)
Thérapie Photodynamique	Porphyrine- Quantum dots (Cd/Se)	-	<200	<p>Cette stratégie s'appuie sur l'association de molécules photo-sensibilisantes (comme la porphyrine) et de la lumière. La destruction des cellules tumorales est induite par la génération d'espèces oxygénées intermédiaires (ROI). Application cutanée : carcinome.</p>	(Schilling, 2010 ; Chatterjee, 2008)

	PEG -Zn-protoporphyrine	-	<10	<p>-PEG augmente la stabilité des suspensions colloïdales.</p> <p>-Eude <i>in vitro</i> : internalisation par les leucocytes humains / stockage en forte concentration dans les lysosomes</p> <p>-Fort potentiel de toxicité après photo-irradiation.</p>	(Regehly, 2007)
Traitement des maladies du cuir chevelu	PLGA	Hinokitio (effet antibactérien et effet anti-inflammatoire)	~200	<p>-Etude <i>in vitro</i> sur des explants de cuir chevelu humain : libération 2 à 2.5 fois plus rapide en présence de NPs de PLGA dans le follicule pileux comparée à une solution aqueuse.</p> <p>-Etude <i>in vivo</i> sur des souris C3H : évaluation de la pousse des cheveux significativement plus grande en présence des particules de Hinokitio-PLGA comparée à une solution aqueuse d' Hinokitio.</p>	(Tsujiimoto, 2007)

	PEG- PCL	Minoxidil	40-130	<p>-Etude <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> sur des cochons d'inde avec ou sans poil.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pénétration plus rapide (1.5 fois dans l'épiderme et 1.7 fois dans le liquide récepteur) des NPs de taille de 40 nm comparée à celle avec des NPs de 130 nm. - Pénétration des NPs par la voie de Shunt comme les follicules pileux. 	(Shim, 2004)
	Liposomes (phospholipides saturés)- cholestérol)	Finasteride	~3000	<p>-Etude <i>in vitro</i> sur de la peau d'abdomen de souris.</p> <ul style="list-style-type: none"> -Meilleure pénétration cutanée (5 fois) du finasteride encapsulé dans les liposomes comparée à la solution aqueuse ou à la forme gel 	(Kumar, 2007)
	Liposomes (phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, sterol)	Cyclosporine A	Non décrite	<p>-Etude <i>in vivo</i> sur des rats souffrant d'alopécie.</p> <ul style="list-style-type: none"> -La repousse des cheveux s'est avérée progressive et présente une plus forte densité au niveau du site d'application après 6 semaines d'application. 	(Verma, 2004)

Disfonctionnement des glandes sébacées	PLGA	Adaptalène	5000	<p>-Etude <i>in vivo</i> sur des rats sans poil.</p> <p>-Les microparticules de 5 µm pénètrent uniquement par les follicules pileux.</p> <p>-Même activité pharmacologique de l'adaptalène chargé dans des microparticules appliquées quotidiennement à une dose de 0.01 % comparée à un gel appliqué quotidiennement à 0.1 %.</p> <p>-Un gel de microparticules à 10 % s'est montré non irritant chez des souris.</p>	(Rolland, 1993)
	SLNs (glyceryl behenate)	Rétinol	~200	<p>-Etude <i>in vitro</i> sur de la peau de porc.</p> <p>-Forte concentration de rétinol retrouvée dans les couches les plus superficielles de la peau (peu de rétinol pénètre plus en profondeur).</p>	(Jenning, 2000)

	SLNs (glycéryl behenate)	Acide rétinoïque	Non décrite	<p>-Etude <i>in vivo</i> du pouvoir irritant de l'acide rétinoïque encapsulé dans des SLNs dispersées soit dans une forme gel ou soit dans une forme crème.</p> <p>-Diminution de l'irritation cutanée quelle que soit la forme utilisée (étude de l'érythème et de l'épaisseur de l'épiderme sur coupes histologiques).</p>	(Castro, 2011)
Dermatothérapie Locale	SLNs (tripalmitine et lécithine de soja)	Photophyllotoxine	~75	<p>-Etude <i>in vitro</i> de la pénétration cutanée dans la peau de porc.</p> <p>-Augmentation de la pénétration cutanée avec les SLNs 3.48 fois supérieure à celle avec une solution contrôlée.</p> <p>-Les SLNs pénètrent par deux voies : au niveau transépidermique et par les follicules pileux. Accumulation de molécules dans les sillons cutanés.</p>	(Chen, 2006)

	Liposomes (lipides cutanées ou phospholipides)	Cyclosporine A	Non décrite	<p>-Etude <i>in vitro</i> sur explants de peau humaine, peau de cochon d'inde et peau de souris.</p> <p>-Pénétration favorisée dans les couches les plus internes par les liposomes formulées avec des lipides cutanés pour la peau de cochon d'inde et de souris mais des résultats inverses observés pour de la peau humaine.</p> <p>-Les liposomes favorisent la pénétration cutanée comparée à une émulsion classique.</p>	(Egbaria, 1991)
	Liposomes (phosphatidilcholine et cholestérol)	Méthotrexate	Non décrite	<p>-Etude <i>in vivo</i> sur des souris albinos atteint de psoriasis : traitement par Méthotrexate chargé dans des liposomes en formulation gel comparé au Méthotrexate en forme gel combiné à une irradiation de 80 J (laser diode).</p> <p>-60 % des souris traitées ne présentent pas de psoriasis 8 mois après le traitement.</p>	(Ali, 2008)

	SLNs (glycerol distearate) NLCs (glycerol distearate – squalene)	8-méthoxypsoralen	200- 300	<p>-Etude de la pénétration cutanée <i>in vitro</i> sur de la peau de souris saine et hyperproliférative (due à une répétition quotidienne de tape-stripping).</p> <p>-Les NPs augmentent significativement la pénétration du 8-méthoxypsoralen comparée à une solution aqueuse.</p> <p>-Aucune différence n'est observée entre les deux types de peau pour les NPs, plus faible pénétration pour la solution contrôle sur une peau avec une hyperprolifération.</p> <p>-Meilleure pénétration transépidermique (1.7 fois) pour les NLCs que pour les SLNs.</p> <p>-Effet occlusif plus grand pour les NLC que pour les SLNs.</p>	(Fang, 2008)
--	--	-------------------	-------------	---	--------------

	Liposomes (phospholipides)	Dinathrol	Non décrite	<p>-Comparaison de formulations de liposomes chargés en dinathrol : forme gel et forme crème et en parallèle une formule contenant des liposomes en suspension aqueuse, sur 20 patients atteint de psoriasis.</p> <p>-Réduction significative du score de sévérité après 4 semaines d'application pour la crème et le gel et 6 pour la suspension de liposomes.</p> <p>-Diminution de l'érythème et de la coloration cutanée avec la forme gel comparée à la forme crème.</p>	(Saraswat, 2007)
	<p>SLNs (glyceryl tripalmitate)</p> <p>NLCs (glyceryl tripalmitate - caprylic/capric triglycerides)</p>	Clotrimazole	400-750	<p>-Formulation de SLNs et NLCs stables pendant 3 mois.</p> <p>-NLCs possèdent un taux d'encapsulation (72%) comparés au SLNs (62%) due à l'ajout d'huile.</p> <p>-La libération est plus longue pour les SLNs comparée à celle pour les NLCs, expliquée par la différence de morphologie des particules.</p> <p>-Pouvoir occlusif plus grand pour les SLNs que pour les NLCs.</p>	(Souto, 2004)

	NLCs	Argent	200	<ul style="list-style-type: none"> -Etude <i>in vivo</i> chez la souris. -Réalisation d'un film en surface de la peau, avec un pouvoir occlusif, réparation du film lipidique. -Augmentation des ions présents dans la peau en présence de NLCs ainsi que dans la membrane des bactéries – augmentation du pouvoir antimicrobien. 	(Keck, 2009)
	SLNs	Glucocorticoïdes: prednisolone (PD), diester prednicarbate (PC), monoester bétaméthasone 17-valérate (BMV)	<500	<ul style="list-style-type: none"> -Profil de libération : PD>PC>BMV encapsulés dans des SLNs ou dispersés dans de la crème. -SLNs influencent la pénétration cutanée des glucocorticoïdes en interagissant avec les lipides de la surface cutanée. -PD et PC sont retrouvés également dans l'épiderme lorsqu'ils sont encapsulés dans des SLNs. 	(Schlupp, 2011)

	cire d'abeille SLNs cire de monostéarine SLNs	Bétaméthasone 17- valérate	125- 135	<p>-Etude <i>in vitro</i> sur de l'épiderme humain</p> <p>-Monostéarine SLNs permettent une libération lente en formant un réservoir de glucocorticoïdes dans l'épiderme permettant de diminuer les effets secondaires dû à l'application topique de glucocorticoïdes.</p> <p>-Les SLNs de cire d'abeille ne permettent pas de réduire la libération du BMV dans la peau</p> <p>-La diffusion des glucocorticoïdes dans la peau est donc fonction du type de lipides utilisés.</p>	(Zhang, 2010)
Thérapie génique	PEG-PLA	ARN interférant (Si- Glo Red –fluorescent)	600- 700	<p>-Etude <i>in vivo</i> sur la souris par injection intradermique.</p> <p>-Libération prolongée du Si-RNA 80 jours après l'injection.</p> <p>-L'activité du Si-RNA est montrée en suivant la réduction du signal de GFP dans l'épiderme pendant les 80 jours qui suivent la libération des NPs.</p>	(Jacobson, 2010)

	PLGA	gènes : SOX9, Cbfa1, and C/EBP- α	<200	<p>-Les NPs de PLGA recouvertes d'un polymère cationique, le polyéthylène imine, augmentent la prise en charge des gènes par des fibroblastes humains, des cellules embryonnaires de rein humain (293T,) et les cellules HeLa <i>in vitro</i>.</p> <p>-Les fibroblastes chargés avec ces NPs et des facteurs de croissance (TGF-β3, BMP-2, or IGF/bFGF) induisent chondrogenèse, ostéogénèse et adipogénèse après transplantation chez des souris sans poil.</p>	(Park, 2013)
Vaccination	PLGA	6-Coumarine	100, 1000, 10000	<p>-Internalisation des particules en fonction de leur taille sur des cellules Caco-2. Les particules de 100 nm pénètrent 2.5 fois plus dans les cellules comparées aux particules de 1 μm et 6 fois plus dans les cellules comparées aux particules de 10 μm.</p> <p>-Chez la souris, après application topique, pénétration des NPs de 100 nm jusqu'aux cellules sub-muqueuses tandis que les particules de 1 μm et de 10 μm sont stockées dans les cellules épithéliales.</p>	(Desai, 1997)

	Chitosan-PLGA PLGA	Ovalbumine (OVA)	170- 180	<p>-Après reconstitution, 74 % de l'activité biologique est conservée avec les NPs de PLGA et 67 % pour les NPs de PLGA recouvertes par du chitosan.</p> <p>-<i>In vitro</i>, OVA encapsulée dans les PLGA NPs et chitosan-PLGA NPs, induit la prolifération des LT CD4⁺ et seulement les OVA- chitosan-PLGA NPs induisent la prolifération des LT CD8⁺.</p> <p>- 2 à 3 fois plus d'OVA retrouvée dans les follicules pileux après application de NPs comparée à une solution classique.</p>	(Mittal, 2013)
--	-----------------------	------------------	-------------	--	----------------

4. Conclusion

L'utilisation des NPs a donc révolutionné les stratégies de traitement et de diagnostic des différentes pathologies permettant le ciblage de cellules incriminées dans la pathologie. Elles permettent ainsi de réduire la dose administrée et de s'affranchir des effets secondaires liés à l'utilisation de forme plus conventionnelle. Au niveau du diagnostic, elles permettent d'améliorer le contraste des images et ainsi de favoriser la détection précoce des pathologies. Les spécificités de ces vecteurs en font des très bons candidats pour l'application en immuno-dermatologie permettant d'envisager de nouvelles stratégies de traitements. Dans cette étude, nous avons développé des NPs encapsulant un mélange de parfums, nous avons ainsi évalué les différentes techniques appliquées à l'encapsulation d'un mélange de molécules odorantes.

Nanoparticules, encapsulation de molécules odorantes

Les molécules odorantes sont retrouvées dans une multitude de produits de notre environnement quotidien, de nos aliments aux détergents en passant par nos produits cosmétiques. Elles présentent des propriétés communes telles qu'un faible poids moléculaire, une faible polarité, une pression de vapeur élevée, un caractère lipophile et des groupes fonctionnels réactifs comme des cétones, des aldéhydes ou encore des acides carboxyliques. De par ces propriétés, les parfums sont des molécules peu stables, facilement oxydables ou dégradables (Ohloff, 1994).

Dans le but de les protéger de leur environnement extérieur, de prévenir leur évaporation, de contrôler leur profil de libération, et de permettre une meilleure dispersion dans les milieux hydrophiles, de nombreux procédés d'encapsulation de parfum au sein de micro / nanoparticules comme la polymérisation interfaciale et la polymérisation *in situ* (Yamato, 1991 ; Kinez, 1996), la coacervation (Fredj, 1984 ; Benoit, 2000).... ont été développés (Feng, 2009). Ces derniers sont souvent décrits dans les brevets.

Initialement, le développement de particules encapsulant des molécules odorantes a principalement été étudié dans les industries cosmétiques et textiles commercialisant des particules de résines de phénol-formaldéhyde ou de mélanine-formaldéhyde. Néanmoins, le procédé de production engendrant des problèmes environnementaux, ces formules ont été substituées par des systèmes à base de polyuréthane. Actuellement, les particules encapsulant des molécules odorantes sont réalisées à partir de polymères naturels, présentant des masses moléculaires et des groupements de surfaces adéquats pour atteindre les propriétés physico-chimiques et mécaniques désirées (Feng, 2009).

1. Stratégie de microencapsulation

La microencapsulation et la nanoencapsulation regroupent l'ensemble des procédés permettant de générer respectivement des microparticules et des nanoparticules. Ces dernières sont composées de matériaux enrobants et de matières dites « actives ». Elles ont été développées afin de répondre à plusieurs objectifs tels que (i) – assurer la protection, la compatibilité, la solubilisation et la stabilisation de la matière active dans un milieu ; (ii) – réaliser une mise en forme adaptée pour une application précise ; (iii) – améliorer la présentation de la matière active ; (iv) – masquer un goût ou une odeur ; (v) – contrôler ou modifier le profil de libération de la matière active.

Les composés matriciels mis en œuvre au cours de la formulation varient en fonction du domaine d'application. Une des premières applications de la micro-encapsulation a été le papier autocopiant sans carbone à base de microcapsules d'encre sensibles à la pression (Benoit JP, 2013).

1.1. Les différentes classes de procédés

Il existe un large nombre de techniques permettant de formuler des particules de 50 nm à 2 mm encapsulant des molécules odorantes à partir de matrices naturelles ou synthétiques tels que les gommages, les polysaccharides, les lipides, les matériaux à base de protéines et un large nombre de polymères synthétiques (Arshady, 1989). Ce dernier ne doit pas interagir avec le parfum encapsulé et doit être facile d'utilisation par exemple présenter une faible viscosité à forte concentration et permettre une élimination totale des solvants utilisés au cours de l'étape d'encapsulation... La formation de microsphères / nanosphères ou de microcapsules / nanocapsules est fonction de la méthode de préparation et de la matrice utilisée. De plus, le choix du procédé et de la formulation déterminent les caractéristiques finales des particules en termes de morphologie, de structure, de taille, de teneur en matière active, de stabilité, et de profil de libération.

Les méthodes de libération sont diverses : elles peuvent (i) - être provoquées par une rupture de la particule due à une action mécanique, thermique, une dissolution éventuellement pH-dépendante ou (ii) - se faire *via* la diffusion des molécules encapsulées et la biodégradation éventuelle de la matrice (Thies, 1996). Dans certains cas, la matrice d'enrobage ne doit pas permettre la diffusion de la molécule, elle doit être totalement étanche et la libération se fera par éclatement ou fusion de la particule sous les effets respectifs de la pression ou de la température. La libération prolongée des molécules encapsulées se fait par diffusion passive combinée à une dégradation ou une dissolution de la matrice. La cinétique de diffusion passive peut être modélisée en utilisant la loi de Fick (Équation 1). Elle est fonction de la structure de la particule ; en effet, les molécules en surface sont libérées plus rapidement que les molécules situées au centre, qui doivent parcourir une distance supérieure pour diffuser depuis le cœur vers l'extérieur de la particule. Dans le cas de microsphères, la loi de Higuchi (Équation 2) est utilisée pour modéliser le profil de libération avec une libération proportionnelle à la racine carrée du temps (Banker, 2002).

	$\frac{dQ}{dt} = K_p \times S \times (C_1 - C_2)$	Équation 1
--	---	------------

Avec $\frac{dQ}{dt}$: flux de diffusion (g.s⁻¹)
 K_p : constante de perméabilité de la matrice (m.s⁻¹)
 S : surface de la particule (m²)
 C_1 : concentration de la substance à l'intérieur de la particule (g.m³)
 C_2 : concentration de la substance dans le milieu extérieur (g.m³)

	$\frac{dQ}{dt} = \left[\frac{D \times C \times C_1}{2 \times t} \right]^{1/2}$	Équation 2
--	---	------------

Avec Q : quantité de substance libérée par unité de surface de matrice (g)
 D : coefficient de diffusion (s.m⁻⁶)
 C : concentration totale en substance (g.m⁻³)
 C_1 : concentration de la substance dans le milieu extérieur (g.m⁻³)
 t : temps de libération (s)

Il existe un grand nombre de procédés d'encapsulation classés selon plusieurs paramètres tels que l'utilisation ou non de solvants organiques, la nature du milieu dispersant (liquide, gazeux, ou à l'état supercritique), l'utilisation de polymères préformés, de lipides ou de monomères, La classification la plus répandue s'intéresse principalement au principe même du procédé, ils sont alors qualifiés de méthodes chimiques, physico-chimiques ou mécaniques. Les méthodes physico-chimiques sont basées sur des variations de (i) - solubilité des agents enrobant sous l'effet de variations de conditions physiques (température, pH, changement d'état...), (ii) - de changements d'état (fusion et solidification) des agents d'enrobage (gélification thermique d'émulsion). Les membranes alors obtenues peuvent être renforcées par adsorption successive de polyélectrolytes de charges opposées. Les méthodes mécaniques ou physiques sont basées sur le séchage ou la solidification de gouttelettes contenant tous les constituants de la future particule. La majorité de ces procédés sont réalisés en deux temps : premièrement, la formation d'une émulsion dont la phase dispersée contiendra le parfum ; deuxièmement, l'émulsion sera séchée ou refroidie, ou polymérisée de façon à obtenir des particules solides (Benoit, 2013). Les méthodes chimiques sont caractérisées par un déclenchement simultané de la synthèse de la membrane (ou de la matrice) et l'encapsulation de la matière active. Elles se démarquent ainsi des deux autres méthodes décrites précédemment, qui font appel à des agents enrobant préformés, tels que les polymères ou des lipides (Madene, 2006). En fonction de la technique choisie, la charge en parfum sera différente ainsi que la taille des particules. Les propriétés des particules obtenues sont répertoriées dans le Tableau 2 .

Tableau 2 : Techniques d'encapsulation disponibles et propriétés des particules générées

Type de méthodes	Méthode d'encapsulation	Taille des particules en μm	Charge maximale des particules (%)	Références
physico-chimiques	Coacervation simple	20 - 200	<60	(Richard, 2000)
	Coacervation complexe	5 - 200	70-90	(Richard, 2000)
	Evaporation – extraction de solvant	0.5 - 200	30-40	(Benoit, 2013)
	Inclusion moléculaire	5 - 50	5-10	(Uhlemann, 2002)
	Gélification thermique	30 – 300	80-95 (micropasule) < 20 (microsphères)	(Benoit, 2013)
chimiques	Polymérisation, polycondensation	0.1 - 1000	>70	(Brown, 2003)
mécaniques	Nébulisation à chaud	1 - 50	<40	(Richard, 2000)
	Nébulisation à froid	20 - 200	10-20	(Uhlemann, 2002)
	Extrusion	200 - 2000	6-20	(Uhlemann, 2002)
	Enrobage en lit fluidisé	< 100	60-90	(Richard, 2000)
	Homogénéisation haute pression	0.1 - 2	-	(Roustel, 2010)
	Sonication	0.1 - 2	-	(Poux, 2004)

1.2. Matériaux mis en œuvre

1.2.1. Agents d'enrobage préformés

1.2.1.1. Les carbohydrates

Les particules de carbohydrates sont principalement obtenues par spray-drying, et sont souvent retrouvées dans l'industrie agroalimentaire (McNamee, 1998). Les principaux carbohydrates utilisés sont les amidons, les maltodextrines, les sirops de maïs ou les gommes d'acacia, présentant un faible coût (Mutka, 1988). De plus, ils possèdent une faible viscosité à forte teneur, et une bonne solubilité dans l'eau. Les maltodextrines et les β -cyclodextrines sont particulièrement utilisés pour encapsuler des molécules odorantes et ces polysaccharides ont été décrits dans de nombreuses études, il s'agit alors de complexes d'inclusion (Reineccius, 1991 ; Goubet, 1998) (Tableau 2)

1.2.1.1.1. Les amidons et leurs dérivés

L'amidon est principalement composé d'amylose, polymère non ramifié s'organisant en hélice α , et d'amylopectine, polymère d'oses ramifiés. Les particules formulées à partir de l'amidon présentent des pores de 1 à 3 μm permettant la rétention d'une forte quantité de molécules. Les cyclodextrines, restent les composés les plus répandues, elles résultent de la dégradation de l'amidon par la bactérie *Bacillus macerans*. Elles appartiennent à la famille

d'oligosaccharides cycliques composés de sous-unités glucopyranose liées en α -(1,4). Au sein des complexes d'inclusion, la rétention peut alors se faire selon deux voies : (i) - les molécules peuvent établir des liaisons hydrophobes avec les hélices α de l'amylose, cette voie est aussi appelée complexe d'inclusion; (ii) - les molécules forment des liaisons polaires avec les groupes hydroxyles des sucres (Arvisenet, 2002 ; Boutboul, 2002) (Tableau 2).

Les maltodextrines présentent un faible coût et une faible viscosité et sont disponibles en différentes masses moléculaires. Elles sont composées de différents degrés de dextrose appelés « dextrose équivalents » (DE) caractérisant le degré d'amidon hydrolysé. Il traduit la capacité à former des matrices poreuses. La capacité de rétention des molécules odorantes va donc dépendre du DE ; les maltodextrines ayant un DE proche de 10 présentent les meilleures capacités d'encapsulation comparées à des degrés plus élevés (15, 20, 25 et 36.5) (Bangs, 1981) (Tableau 2).

1.2.1.1.2. Les gommes

La gomme arabique est très utilisée pour l'encapsulation de parfums présentant un fort pouvoir de rétention. Néanmoins, les gommes restent chères et sont souvent mélangées avec des maltodextrines (Williams, 2000). Apintanapong *et al.* ont étudié différents ratios de ce mélange pour encapsuler du 2-acetyl-1-pyrroline par spray-drying portant l'odeur de pain ou de riz. Le ratio 70 / 30 gomme arabique / maltodextrine a présenté le meilleur taux d'encapsulation (Apintanapong, 2003).

1.2.1.2. Les protéines

Les protéines alimentaires sont également utilisées pour l'encapsulation de molécules odorantes, comme les protéines du sérum de lait, les protéines de soja, les caséinates de sodium. Les protéines présentent de nombreux groupes chimiques et sont amphiphiles, pouvant ainsi interagir avec différents types de substances (Dickinson, 2002). Sheu *et al.* ont notamment encapsulé des molécules odorantes à partir de sérum de lait associé à des carbohydrates ; dans ce contexte, les protéines joueraient le rôle de tensioactifs et les carbohydrates de composés matriciels (Sheu, 1998). La gélatine, produit d'hydrolyse du collagène est largement utilisée dans les procédés de coacervation complexe. La gélatine a également été associée au carboxyméthylcellulose pour former des microcapsules de parfums, ou à des maltodextrines et de la gomme arabique pour l'encapsulation du butanoate d'éthyle, présentant une odeur d'ananas (Bakker, 1999) (Tableau 3).

1.2.1.3. Les polymères synthétiques

Une grande variété de polymères est utilisée pour l'encapsulation comme les polyesters, les polyamides, les polycarbonates, les polyuréthanes et les polyurées. Le choix du polymère dépend du domaine d'application des particules formulées. Dans le domaine de la Santé, il s'agit des dérivés des acides lactiques et glycoliques (PLA, PLGA), l'éthylcellulose, le chitosan et le poly- ϵ -caprolactone qui sont biodégradables. La majorité des particules encapsulant des parfums était composée de résines de formaldéhydes (phénol – formaldéhyde ou mélanine - formaldéhyde) néanmoins pour des raisons environnementales, ces derniers ont été substitués par des polyurées ou polyuréthanes (Tableau 3) (Benoit, 2013).

1.2.1.4. Les lipides

Les lipides solides à température ambiante, tels que les acides gras et leurs dérivés (acide stéarique, acide palmitique ...), les alcools gras, les glycérides à longues chaînes (triglycérides d'acide palmitique, myristique, ou stéariques), les dérivés cholestériques (acétate de cholestérol), les cires d'origines diverses, comme la cire d'abeille, de carnauba, de candelilla... (Tableau 3) (Benoit, 2013).

1.3. Monomères utilisés

Dans le cas des procédés chimiques, la formulation initiale est basée sur la mise en œuvre de plusieurs types de polymères réagissant ensemble pour former la matrice d'enrobage (Tableau 3). Au cours de la polycondensation, le polymère se forme à la surface des gouttelettes d'une émulsion, deux polymères complémentaires sont utilisés, l'un et l'autre étant solubles dans chacune des deux phases. Les couples usuellement mis en œuvre sont dichlorure d'acide / diamine, dichlorure d'acide / diol, diamine / diisocyanate ... (Benoit, 2013).

Lors de la polymérisation radicalaire, un amorceur de radicaux est ajouté pour activer la réaction de polymérisation entre les monomères, le plus souvent il s'agit d'esters acryliques ou méthacryliques. Des monomères fonctionnels assurant la stabilité électrostatiques des dispersions formées et la réticulation des chaînes de polymères à l'intérieur des particules sont habituellement mis en œuvre. Lors de la polymérisation anionique, des monomères de types cyanoacrylates d'alkyle sont pris en compte (Benoit, 2013).

1.4. Additifs

Quels que soient les procédés d'encapsulation, des additifs sont classiquement utilisés dans la formulation des milieux dispersés. Parmi ces composés sont retrouvés (i) - les tensioactifs pour créer ou stabiliser les émulsions directes ou inverses ; (ii) - les dispersants pour former des suspensions stables en phase aqueuse ; (iii) – des additifs anti-agrégation comme des particules de silice ou de talc, pour empêcher les phénomènes d'agrégation au cours du stockage sous forme de poudre ; (iv) – les cryo-protecteurs (mono - , di- et polysaccharides) pour éviter les phénomènes d'agrégaions au cours de la lyophilisation des dispersions aqueuses et assurer une bonne re-dispersion lors de l'utilisation ; (v) – des électrolytes sont également ajoutés aux formulations afin de modifier dans certains cas les profils de libération des substances actives (Benoit, 2013).

Tableau 3 : Classement des différents composés matriciels en fonction du procédé en lien avec les différents champs d'application.

	Composés matriciels	Procédés	Champs d'application
Polymères d'origines naturels	Gélatine	Coacervation simple Coacervation complexe	Arômes Parfums Pharmacie Autocopiants
	Alginate de sodium	Coacervation complexe	Biomédical Arômes Cosmétique Parfums Phytosanitaire
	Chitosane	Coacervation complexe Nébulisation – séchage	Pharmacie Agroalimentaire
	Amidon	Nébulisation – séchage	Agroalimentaire
Polymères cellulosiques	Ethylcellulose	Coacervation simple	Pharmacie
	Hydroxypropylcellulose	Evaporation - extraction de solvant	
	Hydroxypropylmethylcellulose	Evaporation - extraction de solvant	
Polymères synthétiques	Copolymères acryliques ou méthacryliques	Nébulisation – séchage Evaporation - extraction de solvant	Pharmacie
	Polyoléfine	Extrusion	Chimie Biomédical Phytosanitaire
	Copolymères vinyliques	Evaporation de solvant	Pharmacie
	Homopolymères et copolymères d'acides lactiques et glycoliques Poly-(ε-caprolactone)	Nébulisation – séchage Evaporation - extraction de solvant	
Lipides solides	Corps gras solides (esters, alcools, acides gras)	Solidification d'émulsion Nébulisation – séchage	Pharmacie Cosmétiques Parfumerie
	Glycéride		
	Cires (abeilles, carnauba, candelilla ...)		

2. Description des différentes méthodes d'encapsulation

2.1. Les méthodes physico-chimiques

2.1.1. Microencapsulation par coacervation

Le terme de coacervation décrit les phénomènes basés sur la désolvatation des macromolécules, conduisant à une séparation de phases au sein d'une solution. Elle est induite par attraction électrostatique, ou, en affectant les propriétés du solvant. Deux phases sont caractérisées dans le milieu, le coacervat, phase riche en macromolécules et pauvre en solvant, et le surnageant pauvre en macromolécules et riche en solvant.

Au cours de ce procédé, la substance active est dispersée sous forme de gouttes ou de particules, l'encapsulation va alors dépendre des conditions d'étalement des phases en présence (Figure 11).

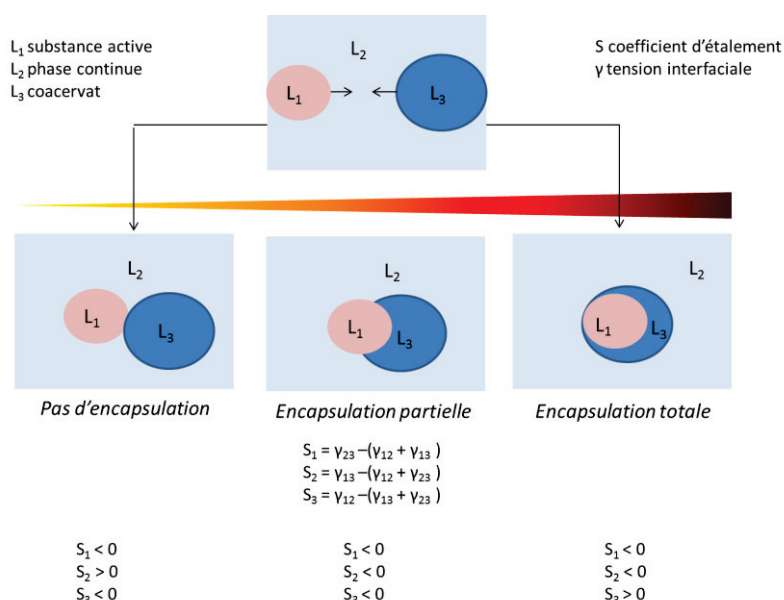


Figure 11 : Comportement d'une gouttelette de substance active (L_1) vis-à-vis d'une gouttelette de coacervat (L_3) dans une phase non miscible (L_2) en fonction des tensions interfaciales et des coefficients d'étalement. Si la tension interfaciale L_1/L_2 (γ_{12}) est plus grande que celle entre L_3 et L_2 , il existe alors trois situations sont alors possibles ; l'encapsulation peut être totale, partielle, ou la substance active peut être non – encapsulée.

Une encapsulation complète a lieu si le coacervat mouille spontanément la surface de la matière active, c'est-à-dire lorsque $S_3 > 0$, $S_2 < 0$, et $S_1 < 0$. Comme la tension interfaciale entre le coacervat et le surnageant est faible (de l'ordre de 0.1 à 0.5 mN.m⁻¹), il suffit que la tension interfaciale γ_{12} soit supérieure γ_{13} pour que S_3 soit positif, définissant ainsi de bonnes conditions d'encapsulation.

La coacervation complexe a été développée en 1955 par Green *et al.* qui réalisèrent des microparticules de gélatine pour l'industrie du papier (Green, 1955).

2.1.1.1. La coacervation simple

Ce procédé repose sur la désolvatation d'un polymère sous l'influence de plusieurs types de facteurs qui sont (i) - l'abaissement de température, (ii)- l'addition d'un non-solvant, (iii)- l'addition d'électrolytes, et (iv) - l'addition d'un deuxième polymère incompatible appelé agent de coacervation. Ce phénomène peut se dérouler dans une phase organique ou aqueuse. En phase organique, le coacervat est formé par un polymère hydrophobe, qui est désolvaté, par exemple avec l'éthylcellulose. En phase aqueuse, un polymère hydrophile est mis en œuvre, le plus souvent il s'agit de la gélatine. Ce dernier est désolvaté par ajout d'électrolytes (dans le cas de la gélatine, il s'agit par exemple du sulfate de sodium). Ainsi, l'encapsulation de molécules odorantes hydrophiles mais également hydrophobes au sein de microparticules. La formulation de microsphères et de microcapsules va être fonction de la quantité de coacervat, si celle-ci est très élevée par rapport à la quantité de matière active des microsphères sont alors obtenues.

Cette technique est facilement transposable à l'échelle industrielle avec des rendements de production et d'encapsulation élevée. Le parfum préalablement solubilisé ou dispersé dans la phase contenant le polymère sera encapsulé au sein du coacervat. Le type de polymère, la concentration, la vitesse d'agitation, la vitesse d'ajout et la viscosité de l'agent de coacervation vont influencer la stabilité et les propriétés des particules. Ces dernières seront ensuite solidifiées par réticulation de l'enrobage et les particules seront lavées, filtrées ou centrifugées puis séchées avant le stockage (Benoit, 2013).

2.1.1.2. La coacervation complexe

La coacervation complexe consiste à la précipitation simultanée de deux polyélectrolytes hydrosolubles portant des charges opposées. La précipitation est engendrée par une modification du pH du milieu réactionnel induisant l'attraction électrostatique des deux polymères. La gélatine a largement été étudiée pour cette application, elle présente un point isoélectrique relativement élevé (4,5) et une charge positive. Les poly-anions les plus répandus sont la gomme arabique, les alginates, les carraghénanes, la carboxyméthylcellulose, les polyphosphates ... Le procédé se déroule comme suit (Figure 12) :

(i) - la matière active solide ou liquide est dispersée dans une solution aqueuse contenant les deux polymères (phase a)

(ii) - la coacervation est ensuite induite par un ajustement de pH de la solution de manière à ce que les charges des deux polymères se neutralisent mutuellement. L'attraction électrostatique des deux polymères entraîne la formation d'un coacervat mixte (phase b)

(iii) - les gouttelettes de coacervat formées viennent s'adsorber à la surface de la matière active (phase c) à encapsuler pour former un enrobage continu (phase d)

(iv) - cet enrobage est consolidé par réticulation des macromolécules constitutives du coacervat en réduisant la température (phase e)

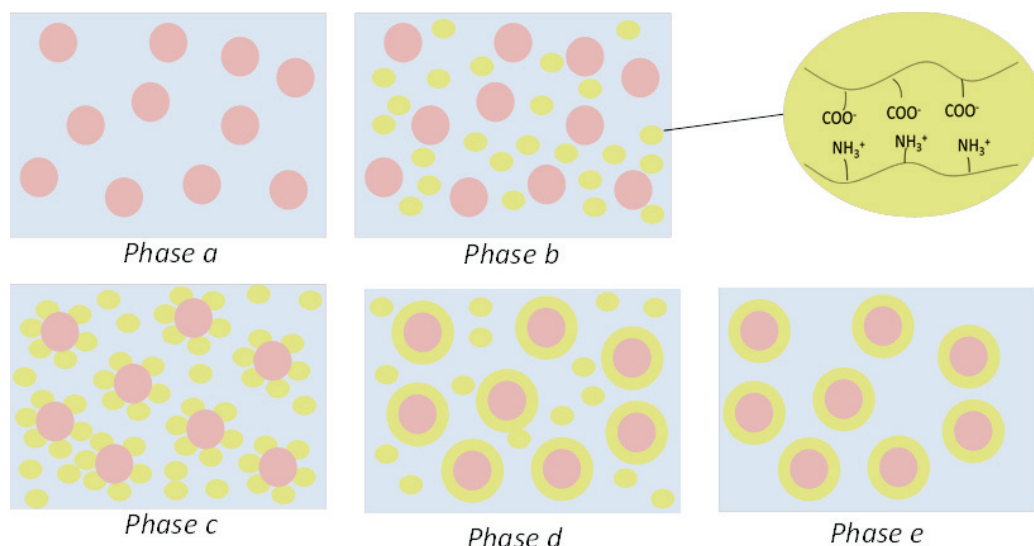


Figure 12 : Principe de la coacervation complexe. (a) - dispersion de la molécule odorante ou de l'huile essentielle dans la solution de polymère ; (b) - ajustement du pH et attraction électrostatique des deux polyélectrolytes ; (c) - absorption ; (d) - enrobage continu ; (e) - réticulation des particules

Dans le domaine de la parfumerie, le plus souvent, le coacervat formé est déposé autour du principe actif lipophile et notamment autour d'huiles essentielles. La réticulation des microcapsules se fait généralement par ajout de glutaraldéhyde ou d'acide tannique. A titre d'exemple, Martins *et al.* développèrent des microparticules d'acide poly-lactique (PLA) de 40 μm encapsulant de l'huile essentielle de thym en mettant en œuvre ce procédé (Martins, 2009). Généralement, l'encapsulation de parfum est réalisée à partir de polymères de faibles masses moléculaires (Soper, 2000 ; Magdassi, 1996 ; Schobel, 1986 ; Whitake, 1991 ; Soper, 1996). Ces procédés permettent d'obtenir des microcapsules dont la taille varie de quelques micromètres à une centaine de micromètres. La taille des particules est étroitement liée à la dispersion initiale.

Ce procédé est facilement industrialisable, en raison de l'absence totale de toute utilisation de solvant organique et présente de très bons rendements de rédaction. Néanmoins, une des limites est liée au choix du composé matriciel, seul un couple de polyélectrolytes portant des charges opposées peut être utilisé. La gélatine reste le composé le plus répandu possédant également des propriétés de gélification. Dans le cas de l'encapsulation de molécules hydrophiles ; une émulsion double de type E/H/E est alors formulée (Benoit, 2013).

2.1.2. Procédé d'évaporation et d'extraction de solvant

Ces procédés sont basés sur la réalisation d'émulsion de type H/E stable suivie de l'évaporation du solvant de la phase interne sous agitation. La phase organique est composée par un polymère hydrophobe et la matière active également hydrophobe, sont solubilisés dans un solvant organique volatil. La phase aqueuse contient le plus souvent un tensioactif permettant de stabiliser l'émulsion. Après émulsification, l'élimination du solvant peut se faire par évaporation directe, le solvant organique diffuse dans la phase aqueuse pour s'évaporer à la surface, ou par extraction par ajout d'un tiers corps. L'élimination du solvant des gouttelettes provoque la précipitation du polymère sous forme de particules (Figure 13).

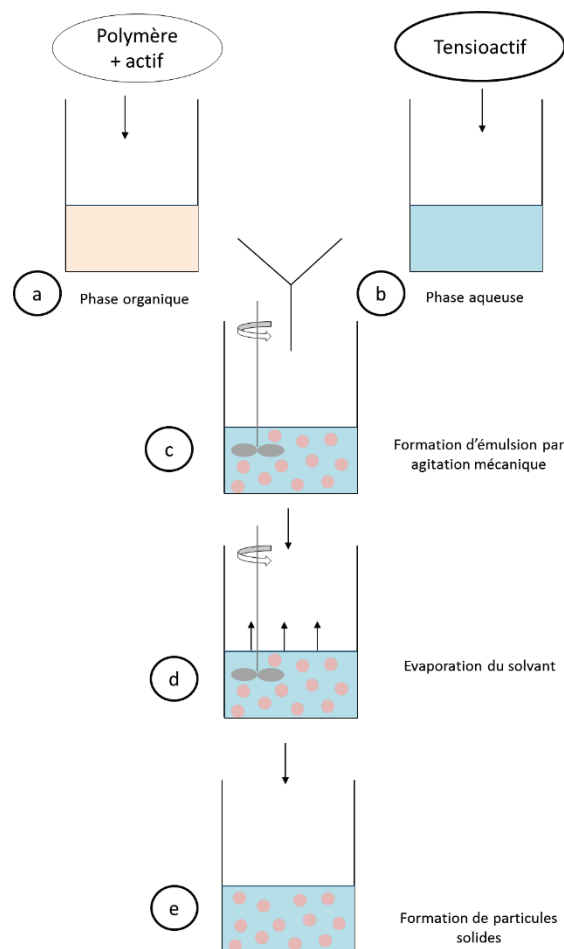


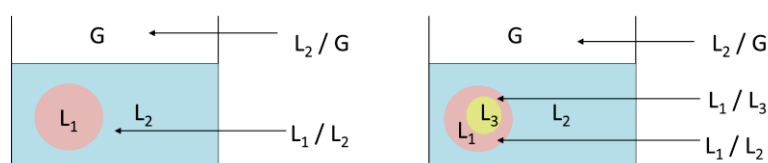
Figure 13: Représentation des différentes étapes du procédé d'encapsulation par évaporation de solvant.

(a) - formation de la phase organique contenant le polymère et l'actif hydrophobe ; (b) – formation de la phase aqueuse contenant le tensioactif ; (c) – émulsification des deux phases par apport d'énergie mécanique ; (d) – évaporation du solvant ; (e) – formation de particules solides en suspension aqueuse.

Les paramètres régissant ce phénomène sont complexes, en effet, le système est caractérisé par l'existence de plusieurs interfaces, au travers desquelles des transferts de matière sont présents jusqu'à la formation des particules (Figure 14). Lors du mélange des

deux phases entre elles, le solvant organique se partage à l'interface L_1 / L_2 pour diffuser à l'interface L_2 / G où il va s'évaporer. Ce partage n'est pas propre au solvant organique, l'actif encapsulé est également soumis au même phénomène, ainsi la vitesse de ces différents transferts influe directement sur les caractéristiques des particules et notamment sur le taux d'encapsulation de l'actif. La taille des particules va dépendre de plusieurs paramètres tels que la vitesse d'émulsification, la viscosité de la phase dispersante, la concentration en tensioactifs, en polymère, le rapport volumique entre les deux phases en présence, de l'équilibre hydrophile – hydrophobe de l'actif... Ce procédé est facile à mettre en œuvre car il ne demande pas d'équipement sophistiqué néanmoins l'utilisation de solvant organique nécessite un recyclage à l'échelle industrielle. De plus, les particules formulées peuvent contenir des traces de solvants organiques qui devront être éliminées.

Dans certains cas, l'évaporation de solvant est effectuée à partir d'une émulsion non aqueuse, la phase continue est alors une phase huileuse non miscible à la phase dispersée. Ce procédé reste peu utilisé compte tenu des difficultés pour éliminer les résidus huileux à la surface des particules (Benoit, 2013).



- L_1 : phase organique dispersée
- L_2 : phase aqueuse dispersante
- L_3 : phase aqueuse interne dispersée
- G : gaz
- L_1 / L_2 : interface phase dispersée et phase dispersante
- L_2 / G : interface phase dispersante et gaz
- L_1 / L_3 : interface phase interne dispersée et phase dispersée

Figure 14 : Représentation des différents phénomènes aboutissant à la formation d'une suspension colloïdale par évaporation de solvant.

2.1.3. Mircoencapsulation par gélification thermique

Ce procédé appelé *hot melt*, est réalisé à une température supérieure à la température de fusion du composé matriciel. La matière active est alors dissoute ou dispersée dans ce matériau fondu. Cette phase est ensuite dispersée au sein d'une phase dispersante préalablement chauffée à la même température. Cette méthode est applicable à l'encapsulation d'actifs hydrophiles et lipophiles, l'actif ne devant présenter aucune affinité avec la phase dispersante choisie. Pour les substances lipophiles, l'eau distillée est généralement choisie, tandis que pour les substances hydrophiles, les huiles de silicone sont

utilisées. La solidification des globules est généralement obtenue en refroidissant brutalement le milieu (Figure 15). Dans le cas des parfums, la formulation ne peut être réalisée à une température trop élevée, ainsi les composés matriciels utilisés sont le plus souvent des lipides avec des bas points de fusion tels que la cire de carnauba, l'alcool cétylique, la cire d'abeille... Néanmoins, un inconvénient majeur est lié au refroidissement des composés matriciels qui peut aboutir à la formation de polymorphes, ces formes cristallines non souhaitées peuvent altérer les caractéristiques des particules générées et provoquer l'expulsion des parfums encapsulés au sein de la matrice (Benoit, 2013).

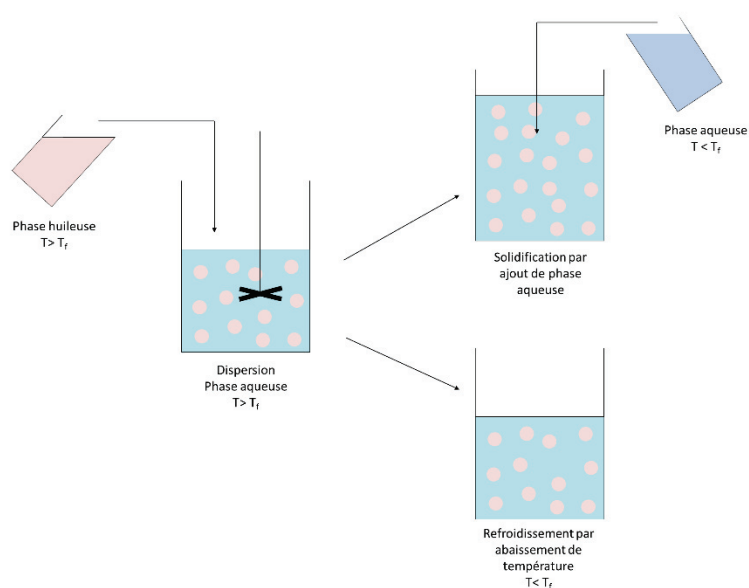


Figure 15 : Représentation des différentes phases du procédé d'encapsulation par gélification thermique (*hot melt*)

2.2. Les méthodes chimiques

2.2.1. La polymérisation

L'enveloppe polymérique est formée par une réaction de polymérisation. Dans un premier temps, une émulsion stable est réalisée, le parfum est introduit dans la phase dispersée. La taille des microsphères obtenues est comprise entre 0.1 et 100 μm et dépend principalement de l'agitation du système. La formation et les caractéristiques de la membrane vont dépendre de la nature des monomères, des tensioactifs et des solvants utilisés.

2.2.2. La polymérisation interfaciale

La polymérisation interfaciale est la technique la plus étudiée depuis quelques années. Elle est basée sur une réaction de polycondensation permettant de préparer *in situ* une membrane de polymère à la surface de gouttes d'émulsion, grâce à une réaction chimique entre deux monomères. Chacune des phases de l'émulsion contient un monomère

qui après réaction vont former une membrane à l'interface. Dans un premier temps, un monomère est solubilisé dans la phase dispersée, puis le second monomère est ajouté à la phase dispersante lorsque l'émulsion possède la distribution de taille souhaitée. Cet ajout va initier la polymérisation. Des molécules hydrophobes mais également hydrophiles peuvent être encapsulées, en formulant des émulsions de type H / E ou E / H (Ouali, 2006 ; Hong, 2000). Les monomères les plus couramment utilisés pour encapsuler des molécules hydrophobes sont des chlorures d'acide ou des di-isocyanates couplés à des diamines conduisant respectivement à des membranes de polyamide ou de polyurée (Figure 16).

Une variante du protocole met en œuvre un seul type de monomères d'isocyanates. Ces derniers sont introduits dans la phase organique en présence du matériau à encapsuler. A la surface des gouttelettes d'émulsion de type H / E, les isocyanates réagissent partiellement avec l'eau pour donner des amines qui réagissent avec les mêmes monomères pour donner une membrane de type polyurée.

Pour le procédé de polymérisation interfaciale, la taille des particules générées est comprise entre 0.5 et 100 μm et est dictée par la taille des gouttelettes de l'émulsion. Les principaux paramètres qui conditionnent les caractéristiques des particules sont : (i) - les paramètres d'agitation tels que la vitesse, le temps, le type de mobile; (ii) - la vitesse d'alimentation des deux monomères qui conditionne la concentration instantanée de ces espèces, et, de ce fait, l'homogénéité de la membrane ainsi que son épaisseur. De plus, au cours de la préparation de l'émulsion, des tensioactifs sont ajoutés, il est important que ces derniers ne réagissent avec les monomères utilisés et qu'ils ne présentent pas d'impuretés susceptibles d'interférer avec la réaction de polymérisation. Les interactions polymère – solvant déterminent l'épaisseur de la membrane polymère, ainsi que la masse moléculaire des chaînes formées. En outre, la densité du solvant affecte directement la stabilité de l'émulsion générée. Les principales limitations sont liées aux possibilités de réactions chimiques incontrôlées entre le parfum et les monomères (Benoit, 2013).

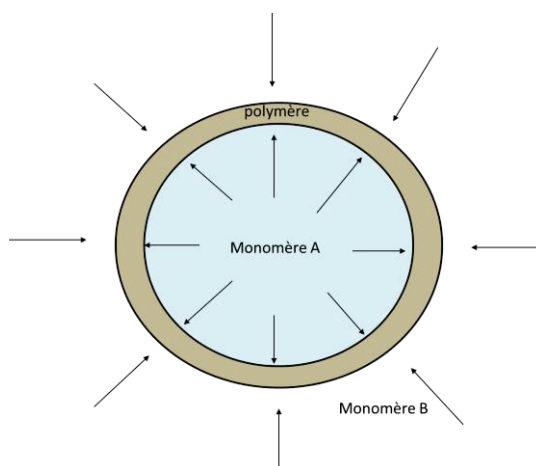


Figure 16: Représentation du mécanisme de la polymérisation interfaciale

2.2.2.1. La polymérisation en milieu dispersé

Ce procédé permet la formation de microparticules à partir de monomères synthétiques du type acryliques, vinyliques ou cyanoacrylates d'alkyle. Il met en jeu une phase de formation des particules appelée nucléation et une phase de croissance donnant lieu à la génération de particules. Les caractéristiques physiques et mécaniques des particules, vont dépendre du type et de la quantité de monomères utilisés. Il existe deux mécanismes possibles : la polymérisation en suspension et la polymérisation *in situ*. La polymérisation en suspension se déroule dans une phase homogène, le plus souvent aqueuse, où la nucléation aura lieu. Les monomères et le parfum sont solubilisés à l'aide d'un tensioactif dans cette phase continue. Sous l'action d'un initiateur, la polymérisation est amorcée et les oligomères vont précipiter sous forme d'agrégats stabilisés par le tensioactif. La polymérisation se déroule exclusivement dans la phase continue et est stoppée lorsque l'ensemble des monomères sont consommés. Lors de la polymérisation *in situ*, une émulsion de monomères en phase aqueuse est réalisée. Le parfum est généralement dispersé en amont dans cette phase. L'ajout d'un amorceur, le plus souvent un pré-polymère, engendre une polymérisation *in situ* radicalaire ou anionique en fonction des monomères utilisés.

La polymérisation en milieu dispersé a ainsi été adoptée pour préparer des microparticules de l'ordre de 200 μm encapsulant du dicyclopentadiène, molécule odorante à l'odeur de camphre, en utilisant du formaldéhyde d'urée (Brown, 2003). Le formaldéhyde de mélanine est également utilisé pour l'encapsulation de parfums (Lee, 2002).

2.3. L'inclusion moléculaire

Les cyclodextrines sont des molécules d'amidon modifiées par isomérisation enzymatique, le plus souvent par l'action de la glucosyltransférase. Après clivage, les deux parties basales se lient de façon covalente et une structure sphérique est obtenue. Les

différents types de cyclodextrines et leur utilisation ont largement été étudiés par Hedges *et al.* (Hedges, 2004). Le cœur de la structure est considéré comme hydrophobe permettant l'encapsulation de molécules hydrophobes comme la majorité des parfums. Au contraire, la surface de la structure est considérée comme hydrophile. L'encapsulation des parfums sera influencée par la masse moléculaire, l'encombrement stérique, les fonctions chimiques, la polarité et la volatilité des molécules odorantes (Goubet, 1998). Pour augmenter la stabilité thermique des complexes d'inclusion, Jouquand *et al.* ont proposé l'ajout de maltodextrine (Jouquand, 2004).

2.4. Les méthodes mécaniques

2.4.1. La nébulisation-séchage ou « spray-drying »

Il s'agit d'une technique industrielle, continue, en une seule étape, permettant de transformer une formulation liquide initiale en microparticules sèches encapsulant des molécules odorantes (Ouali, 2007 ; Hong, 2000). Les formulations liquides sont : (i) - des solutions de parfums et du matériau enrobant ; (ii) - des dispersions de parfums dans une solution ou une émulsion de composé matriciel ; (iii) - des émulsions de parfums dispersées dans une solution de composé matriciel. L'appareillage est composé d'une chambre de dessiccation au sommet de laquelle la formulation initiale est nébulisée à travers une buse d'atomisation pneumatique, ultrasonore ou rotative permettant la formation d'un aérosol. Ce dernier est mis en contact avec un flux d'air ou d'azote porté à température contrôlée, dans une chambre de dessiccation. Les gouttelettes formées entrent en contact avec un flux d'air établi à co-courant, préalablement filtré et chauffé. Le séchage rapide, par évaporation du solvant, provoque la formation de microparticules solides. La poudre de microparticules est ensuite séparée de l'air contenant le solvant vaporisé collectée à la base de la chambre dans un cyclone. Le procédé peut être utilisé pour des formulations en phase aqueuse ou en phase organique. Une autre configuration de l'appareillage est disponible, permettant un séchage à contre-courant. Dans ce cas, la buse de nébulisation est située à la base de la chambre de dessiccation et les gouttelettes présentent donc initialement une vitesse et une trajectoire opposées au flux d'air, alors que dans la configuration à co-courant, le flux d'air et la trajectoire des gouttelettes d'aérosol ont la même direction et le même sens (Figure 17).

La taille moyenne des microparticules obtenues par nébulisation-séchage est comprise entre environ 1 et 50 μm pour un séchage à co-courant et 50 et 200 μm pour un séchage à contre-courant, celles-ci résultent alors de l'agrégation de plus petites particules. La distribution granulométrique est large avec des écart-types élevés. Le taux d'encapsulation est limité à environ 40 %. Les conditions optimales sont décrites avec des matériaux d'enrobages hydrophiles, de faible viscosité à forte concentration (Reineccius,

1989). Les propriétés des microparticules sont alors dépendantes de la composition du matériau d'enrobage, de la quantité de parfum par rapport à la quantité de matériau d'enrobage, des paramètres de nébulisation et de séchage (pression et débit d'atomisation, température et débit d'air), et du taux d'humidité de la chambre de nébulisation (Young, 1993a ; 1993b ; Kerkhof, 1994). Le plus souvent des microsphères sont générées avec une forme sphérique, mais parfois leur structure est perturbée par la présence de défauts et de déformations telles que des cratères ou des structures spongieuses pouvant entraîner une libération immédiate de la substance active. Ainsi, cette méthode reste peu adaptée à l'encapsulation de molécules odorantes. De plus, du fait de l'évaporation du solvant, la température des gouttelettes d'aérosol reste basse malgré le contact avec l'air chaud, elle peut cependant augmenter, entraînant ainsi une évaporation du parfum. Il faut également noté que des phénomènes d'oxydation de la molécule odorante sont également reportés au contact de l'air dans la chambre de dessiccation (Desobry, 1997).

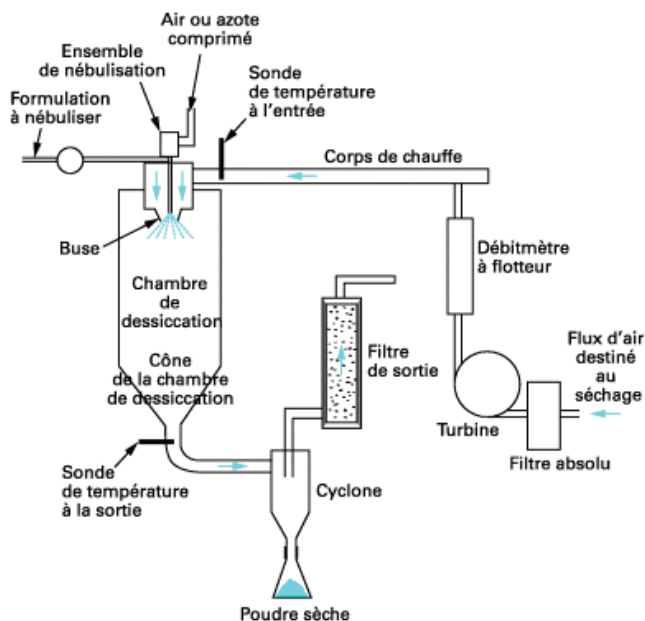


Figure 17: Schéma représentant le dispositif de nébulisation-séchage

Pour pallier ces inconvénients, les techniques de nébulisation en milieu supercritique ont été développées, et appliquées à l'encapsulation de molécules odorantes (Augustin, 2001). Une substance à l'état supercritique se trouve dans un état intermédiaire entre l'état liquide et l'état gazeux, présentant un fort pouvoir solubilisant. Le dioxyde de carbone se place comme un composé de choix ; en effet, son état supercritique est facilement atteignable, sa température critique est de 31,1 °C avec une pression critique de 73,8 bars et il n'est pas toxique. Le fluide à l'état supercritique peut être utilisé en tant que solvant ou non solvant. De tels procédés sont qualifiés d'ASES (*Aerosol Solvent Extraction System*). Ils

consistent à dissoudre le matériau d'enrobage et dissoudre ou disperser le parfum dans un solvant organique puis à atomiser l'ensemble dans une colonne où circule le fluide en phase supercritique. Une extraction du solvant dans le fluide en phase supercritique est alors observée, induisant la formation des microparticules (Perrut, 2003). Une autre méthode est appelée RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solutions*) ; le fluide supercritique est alors utilisé comme solvant du matériau d'enrobage et du parfum. Cette solution est nébulisée dans un milieu de pression inférieure au point critique, entraînant l'expansion brutale du fluide se trouvant initialement à l'état supercritique et la précipitation des solutés sous forme de microsphères. En effet, une forte diminution de la densité du solvant donne lieu à une forte diminution de la solubilité du matériau d'enrobage et du parfum initialement dissous (Benoit, 2013).

Le procédé de nébulisation – séchage peut être facilement industrialisable, demandant une maîtrise de nombreux facteurs au cours de la transposition d'échelle. Ces facteurs sont liés à la formulation tels que la concentration en parfums ou en composé matriciel, la viscosité de la phase dispersante, ou encore à la température de l'air entrant (40 et 200°C), le débit de la formulation à nébuliser et à sécher (de 3 mL .min⁻¹ à quelques litres par minutes) modifiant le taux d'encapsulation et la distribution de taille des particules. Cette méthode présente un coût relativement faible, qui nécessite un équipement très largement utilisé dans de nombreux secteurs industriels de type agroalimentaires, pharmaceutiques, chimiques...

2.4.2. L'enrobage en lit fluidisé

Le procédé d'enrobage en lit fluidisé s'applique exclusivement à des matières actives constituées de particules solides (granulés, cristaux). Des matières actives liquides peuvent néanmoins être encapsulées après adsorption par des supports particulaires poreux. Ce procédé consiste à réaliser un enrobage continu de la particule. Les particules sont fluidisées dans une chambre en forme de cylindre vertical où elles vont être mise en mouvement par circulation d'air chaud à contre-courant. Cette fluidisation permet d'assurer un mélange constant de la colonne de particules avec un transfert de chaleur optimal entre l'air et la surface des particules. Une buse de pulvérisation placée au-dessus ou à la base de la suspension de particules permet de disperser, sous forme de fines gouttelettes, le matériau enrobant à la surface des particules. La formation du film d'enrobage s'effectue au contact des particules après des étapes successives de mouillage, étalement puis séchage par évaporation du solvant contenant les gouttelettes de matériau enrobant. La fluidisation de la colonne de particules résulte de l'apparition d'une pression différentielle Δp entre la base et le sommet de celle-ci, générée par le flux d'air. Initialement la colonne de particules solides

placée dans une cuve à fond perforé et traversée de bas en haut par un flux d'air. Si la vitesse de l'air (v) est nulle, les particules forment un lit fixe, dans lesquelles les particules sont en contact les unes des autres (Figure 18a). Quand la vitesse v augmente, une différence de pression est alors observable entre la base et le sommet de la colonne. La vitesse minimale de fluidisation v_f induit une force exercée par le flux d'air sur chaque particule égale à leur poids, la colonne de particules est alors en suspension fluide (Figure 18b). La pression différentielle est alors maximale et notée Δp_e et se conserve jusqu'à la vitesse seuil v_s pour laquelle il apparaît alors un phénomène de transport des particules. Une décroissance de la pression différentielle est alors observée en fonction de la vitesse de l'air du lit fluidisé (Figure 18) (Benoit, 2013).

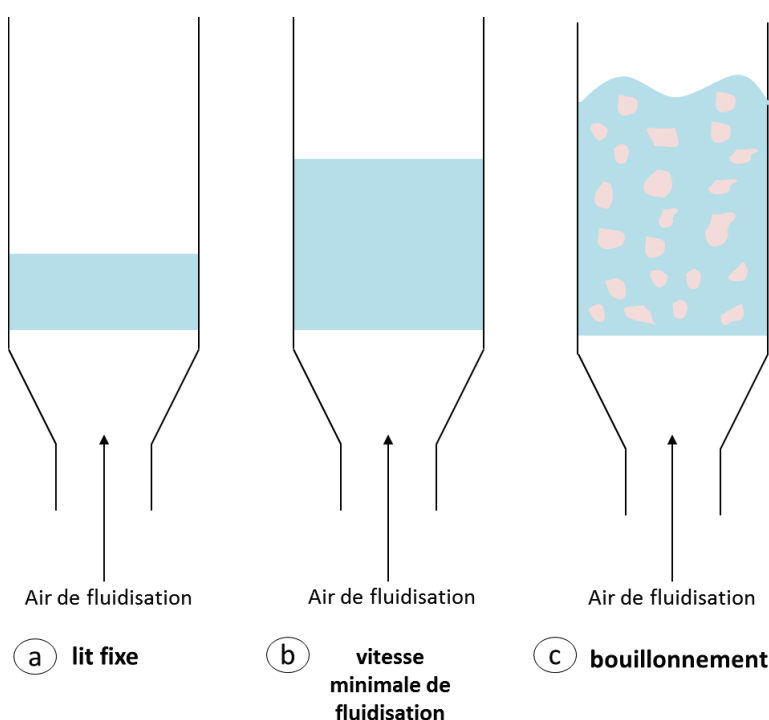


Figure 18: Représentation des différentes phases de la fluidisation : (a) – lit fixe ; (b) – vitesse minimale de fluidisation ; (c) – bouillonnement

Le plus souvent les matériaux d'enrobage sont des dérivées de cellulose (éthyle cellulose, hydroxypropylméthylcellulose, ...) ou des copolymères acryliques, dans certaines techniques, des corps gras ou des cires sont également mis en œuvre dans le cas des techniques de type « *hot melt coating* », qui consistent à former un film continu et solide après refroidissement. Ces formulations contiennent également des plastifiants des polymères comme des phtalates d'éthyle qui favorisent la formation du film d'enrobage à la température de séchage et des additifs, comme des anti-mottants et des lubrifiants (talc, stéarate de magnésium). Le matériau enrobant est pulvérisé sur la suspension fluide sous la forme d'une formulation liquide, grâce à une buse de pulvérisation. La buse est généralement une buse bi-fluide dans laquelle la formulation liquide est véhiculée à basse

pression et rencontre un jet d'air comprimé qui la disperse en fines gouttelettes. Ces gouttelettes vont entrer en contact avec la surface de la particule et s'y déposer. La formation du film d'enrobage s'effectue en plusieurs étapes successives qui sont : (i) - le contact microparticules – gouttelettes, suivi par (ii) - le mouillage et de l'étalement de la gouttelette sur la particule, puis (iii) - le film se forme par séchage, après l'évaporation du solvant. Les paramètres influençant le procédé sont le volume d'air fluidisé, la température de l'air et le degré d'humidité de l'air. Ces paramètres conditionnent la vitesse d'évaporation du solvant qui affecte directement la qualité du film et la distribution granulométrique finale. La vitesse de l'air doit être nettement supérieure à v_f sans dépasser la v_s (Figure 19). Dans cette plage de vitesse, une fluidisation plus importante de la suspension qui est connue sous le nom de bouillonnement « *bubbling fluidization* » (Figure 18c). La colonne fluide présente alors deux phases distinctes : une suspension homogène dans l'air et des bulles d'air dispersées dans cette suspension. Une évaporation très rapide risque d'entraîner la formation de fines particules de matériau enrobant par un séchage prématuré des gouttelettes avant même qu'elles n'atteignent les particules à enrober. Une évaporation trop lente favorise la formation d'agréats de particules, en effet, au moment de leurs contacts, le film d'enrobage peut être encore humide et, de ce fait, adhésif. La concentration et le débit de pulvérisation doivent être ajustés en fonction des paramètres de séchage, de façon à ne pas favoriser l'agglomération des particules lors de leurs collisions. La concentration est variable et comprise entre 10 et 30 % (en masse). La taille des gouttelettes doit toujours rester petite devant la taille des particules à enrober (rapport des tailles d'un facteur 10 au moins). La taille des gouttelettes dépend de la pression de pulvérisation, ainsi que des caractéristiques de la formulation, telles que la viscosité et la tension superficielle. L'épaisseur des films d'enrobage déposés sur des particules en lit fluidisé est généralement comprise entre 1 et 20 μm , le film devant être suffisamment épais pour masquer les défauts de surface. Le taux d'encapsulation est généralement élevé, compris entre 60 et 90 % (en masse) (Jacquot, 2003). Ce procédé a été utilisé pour l'encapsulation de parfums par Lee *et al.* (Lee, 2002).

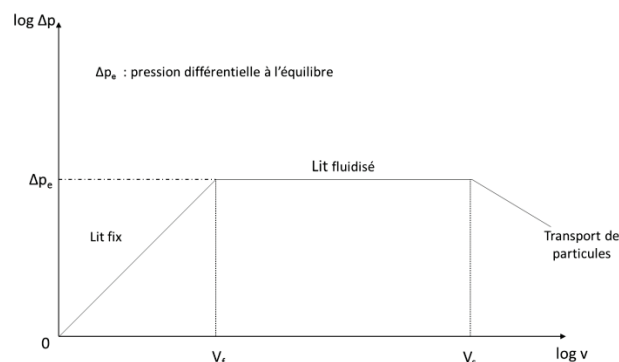


Figure 19: Evolution de la pression différentielle en fonction de la vitesse du fluide dans un procédé de lit fluidisé

Un autre procédé dit d'«imprégnation» consiste à charger de parfum des particules de polymères préformées. La première phase de ce procédé consiste à augmenter la porosité des particules par gonflement du polymère exposé à un fluide supercritique. Puis, du fluide supercritique contenant le parfum est introduit entraînant le transfert de ce dernier vers la phase polymère. Enfin, le fluide est évacué de manière progressive, le parfum reste alors dans les particules qui vont ensuite subir une étape d'enrobage en lit fluidisé (Hu, 2011).

2.4.3. L'extrusion

En 1957, Swisher *et al.* publièrent le premier brevet portant sur l'extrusion (Swisher, 1958). Les premières microparticules encapsulant des parfums ont été développées à partir de matrice de glucides (Reineccius, 1991). Dans un premier temps, le composé volatil est dispersé dans une matrice polymère. Elle a pour but de convertir un matériau brut en un produit de forme définie et de densité uniforme. Ce mélange est ensuite poussé à travers une filière sous condition de température contrôlée (entre 70 et 150 °C). Le filament obtenu peut être broyé pour obtenir des nanoparticules. Cependant, le simple broyage peut conduire à des irrégularités de surface et à des tailles très hétérogènes, d'où une étape supplémentaire: la sphéronisation. Durant le procédé mécanique de sphéronisation, les cylindres obtenus après extrusion sont déposés sur un disque tournant strié. Le disque les entraîne dans son sens de rotation tandis que la force centrifuge les envoie contre la paroi du sphéroniseur. Ce mouvement intensif de rotation et de friction façonne la surface des particules et entraîne la formation de sphères de taille généralement assez élevée (supérieure à 200 µm) dépendant essentiellement de la vitesse de rotation et du temps de sphéronisation. La seconde méthode d'obtention est l'introduction sous forme de goutte à goutte du filament dans un milieu desséchant. Pour diminuer la taille des gouttes, des forces additionnelles à la gravité pourront être ajoutées comme des flux d'air, des vibrations, ... (Rizvi, 1995 ; Crocker, 1978).

De plus, le procédé de co-extrusion va permettre d'enrober les substances naturelles d'une membrane de polymère, les deux fluides sont injectés dans un cylindre rotatif par deux buses distinctes. Le plus souvent la technique d'émulsification est réalisée en amont pour réduire la taille des gouttes (Schalmeus, 1995).

La mise en œuvre de ce procédé nécessite que le parfum soit stable et thermodynamiquement à la température d'extrusion. Le taux d'encapsulation doit rester inférieur à 50% (en masse) et les tailles initiales des poudres de polymère et de matière active doivent rester voisines pour éviter l'apparition de défauts d'extrusion et conserver une distribution homogène du parfum dans le filament avant découpe. La taille des

microparticules obtenues est supérieure à 200 µm. Cette technique a été utilisée pour la formulation de capsules de parfums (Laurent, 2008) et de particules d'alginate de vanille (Manojlovic, 2008).

3. Développement des nanoparticules ou de particules submicroniques odorantes

Avec le développement des NPs odorantes, les procédés de microencapsulation ont été ajustés. Par exemple, Jafari *et al.* ont adapté la méthode de nébulisation-séchage pour encapsuler du limonène dans un mélange de maltodextrine, d'amidon et de protéines de lait. La réaction permet d'obtenir un taux d'encapsulation proche de 86 % et des particules de tailles comprises entre 700 et 800 µm. L'ajout d'un tensioactif diminue significativement la taille des NPs mais s'accompagne également d'une réduction du taux d'encapsulation (Jafari, 2007). De manière générale, les NPs sont utilisées pour augmenter le contrôle de la libération des parfums (Shefer, 2006). De nombreux brevets ont été développés et sont décrits dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Brevets portant sur les méthodes d'encapsulation des molécules odorantes

Inventeurs	Année	Méthodes d'encapsulation	Invention	Références
Ness <i>et al.</i>	2001	Absorption physique	Encapsulation de parfums hydrophobes à partir de nanoparticules de polymères poreuses	(Ness, 2001)
Dungworth <i>et al.</i>	2001	Absorption physique	Encapsulation de parfums hydrophobes à partir de nanoparticules de polymères poreuses possédant des groupements hydroxyles en surface recouvertes d'un autre polymère greffé en surface.	(Dungworth, 2001)
Chow <i>et al.</i>	2006	Nébulisation à chaud	Encapsulation de parfums à l'intérieur de nanoparticules. Utilisation d'un système à double entrée.	(Chow, 2006)
Ouali <i>et al.</i>	2004	Polymérisation interfaciale	Encapsulation de molécules odorantes dans des nanoparticules. Le parfum est solubilisé dans une phase comprenant un monomère liquide et des initiateurs de réactions pouvant également jouer le rôle d'émulsifiant.	(Ouali, 2004)

Jong-Yea <i>et al.</i>	2009	Polymérisation interfaciale	Encapsulation de molécules odorantes à partir d'un protocole en trois étapes. Premièrement, le monomère est solubilisé dans un milieu où son polymère n'est pas soluble. Le milieu va contenir un initiateur de réaction, un agent de réticulation et un stabilisant. Le milieu est ensuite chauffé entre 50 et 90°C pour amorcer la polymérisation. Un solvant organique est utilisé pour extraire les monomères n'ayant pas réagi. Puis un agent chimique est ajouté de manière à modifier les parties hydrophobes des nanoparticules pour augmenter leur hydrophilie.	(Jong-Yea, 2009)
Monsalve-Gonzalez <i>et al.</i>	2009	Polymérisation micellaire	Formation de structures liquides de taille nanométrique contenant de l'eau, un co-solvant de polyol (polyalcool...), un tensioactif hydrophile, un co-tensioactif de type alcool gras en C ₁₂₋₁₆ , une huile comprenant de longues chaînes carbonées pouvant solubiliser les molécules odorantes.	(Monsalve, 2009)
Laurent <i>et al.</i>	2009	Extrusion	Nano-émulsions de type huile dans eau de molécules odorantes obtenues par extrusion.	(Laurent, 2008)

Les NPs présentent de nombreux intérêts, essentiellement liés à leur faible taille. Leur principale caractéristique est liée à la formulation de suspensions stables, en effet, les NPs ne sont pas soumises à la gravité et vont adopter en solution un mouvement brownien. De plus, leur faible taille, leur confère une grande surface spécifique, et possèdent donc un fort caractère solubilisant. Tout comme pour la microencapsulation, il existe de nombreuses techniques de préparation de ces structures qui conduisent à la formulation de NPs possédant des propriétés physico-chimiques distinctes. Elles sont principalement basées sur des mécanismes de polymérisation de monomères ou sur l'utilisation de polymères préformés. Les méthodes de préparation des nanoparticules lipidiques peuvent nécessiter quant à elles la mise en œuvre de méthodes spécifiques.

3.1. La nanoprécipitation

Cette méthode fait appel à l'utilisation de polymères préformés. Le principe s'appuie sur la précipitation d'un polymère hydrophobe dans un milieu hydrophile. La nanoprécipitation également appelée « déplacement de solvant », consiste à solubiliser une molécule odorante ou une huile essentielle avec un polymère préformé dans un solvant organique. Le solvant choisi est généralement un solvant semi-polaire tel que l'acétone ou l'éthanol miscible à l'eau en toutes proportions. Cette solution est injectée sous forme de

goutte à goutte, dans une phase aqueuse contenant éventuellement un tensioactif hydrophile sous agitation modérée. Le polymère n'étant pas soluble dans cette nouvelle phase, précipite instantanément sous forme de nanoparticules piégeant ainsi la molécule odorante ou l'huile essentielle. Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation sous pression réduite (Figure 20) (Fessi, 1989).

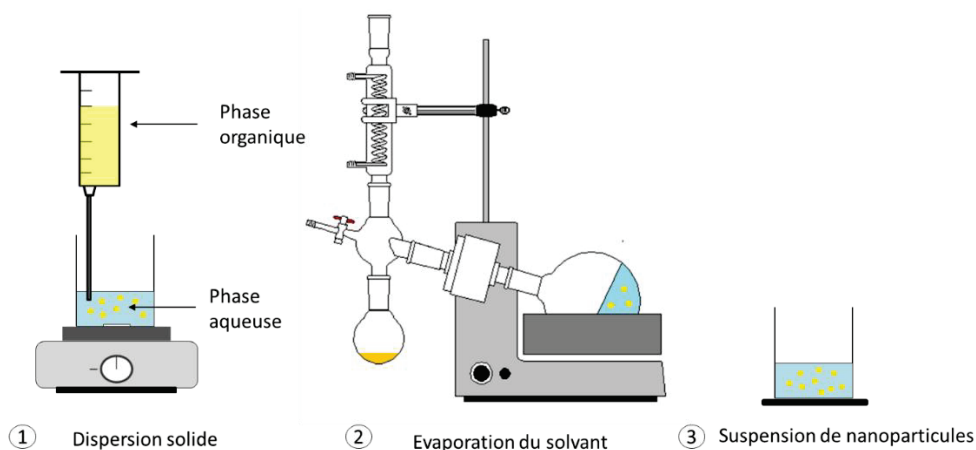


Figure 20 : Description du procédé de nanoprécipitation permettant d'obtenir des nanosphères ou des nanocapsules.

Yen *et al.* formulèrent par exemple des NPs de curcumin à partir de polyvinylpyrrolidone, de taille proche de 140 nm avec un faible indice de polydispersité (0.19) et un taux d'encapsulation de 99.9 % (Yen, 2010). Sansukcharearnpon *et al.* ont réalisé l'encapsulation de six molécules odorantes (camphre, citronellal, eucalyptol, limonène, menthol et 4-tert-butylcyclohexyl acétate) au sein de NPs d'un mélange d'éthylcellulose (EC), d'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) et d'alcool poly (vinylique) (PV(OH)) *via* cette méthode. Les NPs générées ont alors possédé une taille inférieure à 450 nm avec des taux d'encapsulation variant entre 40 et 80 % selon les molécules (Sansukcharearnpon, 2010).

3.2. Les méthodes de polymérisation

Les méthodes d'encapsulation utilisant la polymérisation permettent de produire des nanosphères et des nanocapsules de petite taille (inférieure à 500 nm). Plusieurs techniques de polymérisation ont été développées, adaptées à l'encapsulation de molécules odorantes permettant d'obtenir des efficacités d'encapsulation importantes.

3.2.1. La polymérisation micellaire : microémulsion

Le parfum est émulsionné dans la phase aqueuse sous forme de micelles, cette phase contient une quantité importante de tensioactifs. Les monomères sont ajoutés et vont polymériser sous l'effet d'un initiateur. Les NPs d'amidon de maïs obtenues sont ensuite isolées et purifiées par ultracentrifugation ou par dialyse (Jong-Yea, 2009).

3.2.2. La polymérisation interfaciale

La polymérisation est appliquée aux monomères cyanoacryliques, ainsi qu'aux polymères classiques en polycondensation interfaciale (polyamide, polyurée...). Les monomères sont dissous dans une solution d'éthanol (le plus souvent) contenant une huile essentielle et / ou un parfum. Cette solution est ensuite injectée dans une phase aqueuse contenant un tensioactif, la diffusion de l'éthanol provoque la formation instantanée de nanogouttelettes. Parallèlement, les monomères s'orientent à l'interface huile / eau et la polymérisation est initiée par les ions OH du milieu à pH neutre (4-10) résultant en la formation d'une membrane de polymère autour des gouttes huileuses. La deuxième méthode consiste à introduire un monomère dans chacune des phases organique et aqueuse. La solution organique est alors composée d'un solvant polaire miscible à l'eau (acétone, alcool), de l'huile essentielle et ou du parfum, et d'un monomère lipophile. La phase aqueuse contient un tensioactif et le monomère hydrophile. Comme précédemment, la diffusion du solvant dans l'eau provoque la formation de nanogouttelettes, la réaction entre les deux monomères à l'interface conduit à la formation de la membrane des capsules (Monsalve-Gonzalez, 2009).

Hu J *et al.* ont préparé des NPs de polybutylcyanoacrylate encapsulant de l'huile essentielle de rose à partir d'un procédé de polymérisation activé par le pH. Les nanocapsules obtenues possèdent une taille entre 50 et 100 nm en fonction de la concentration en huile essentielle, avec un taux d'encapsulation compris entre 25 et 60 %. Le taux d'encapsulation ne prend pas en compte l'encapsulation de l'ensemble des molécules de l'huile essentielle mais de la masse totale de parfums encapsulés. Ces nanoparticules sont préparées en vue d'être utilisées dans l'industrie textile (Hu, 2011). Les méthodes basées sur l'homogénéisation

Afin de générer des émulsions avec une taille de goutte nanométrique, plusieurs technologies ont été mises en œuvre. Ces conditions sont obtenues aux moyens d'outils apportant un très fort cisaillement combinés à d'autres dispositifs mécaniques. Toutes ces techniques sont compatibles avec la méthode de gélification thermique et sont mises en œuvre, pour des phases grasses à faibles points de fusion, solides à température ambiante.

3.2.3. Homogénéisation par fort cisaillement

Les appareils de fort cisaillement possèdent des structures complexes, visant à forcer le passage de la dispersion dans une zone confinée où elle subit de très forts gradients de vitesse. Le système le plus couramment utilisé est le dispositif rotor-stator. Le stator est percé d'orifices ou de fentes plus ou moins fines et resserrées, et le rotor va tourner à de très

grande vitesse. Au cours du procédé, l'émulsion est aspirée dans la tête de travail, et expulsée après avoir traversé les lames du rotor et du stator subissant ainsi un très fort cisaillement dû aux très faibles distances entre ces deux dispositifs (quelques millimètres) et à la vitesse élevée (Figure 21). De manière générale, la taille des gouttelettes et la distribution diminuent en fonction de la durée d'agitation et se stabilise au-delà d'une durée optimale. Dans les premières secondes du procédé d'émulsification la taille des gouttes diminue très rapidement jusqu'à atteindre un palier qui correspond à un équilibre entre les processus de rupture et de coalescence. Une distribution de gouttes bimodale peut évoluer vers une distribution monomodale sous agitation, expliquant ainsi la diminution de la distribution de taille. Cependant, dans le cas des émulsions très concentrées, l'augmentation de la durée d'agitation peut provoquer l'apparition d'une distribution bimodale, qui s'explique par la viscoélasticité du milieu avec la diminution de la taille des gouttes (Poux, 2004).

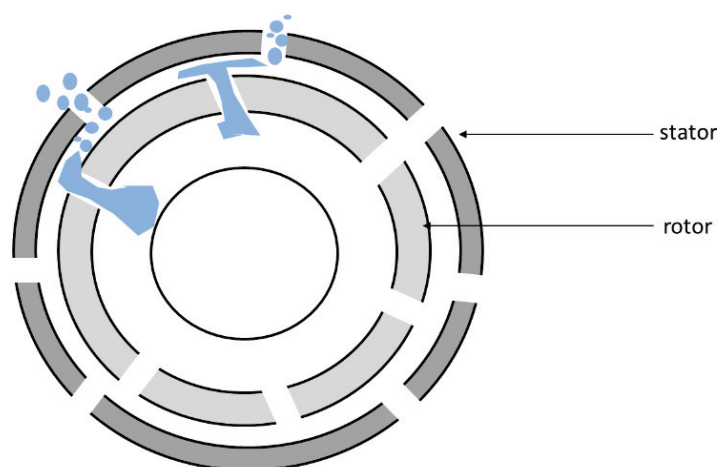


Figure 21: Principe de fonctionnement d'un mobile de type rotor-stator

3.2.4. Homogénéisation haute pression

La principale fonction de ce procédé mécanique est de stabiliser les émulsions afin de limiter les phénomènes de déstabilisation comme la sédimentation ou le crémage, en diminuant la taille des gouttes dispersées. Ces méthodes fonctionnent selon le principe de la pompe à piston, une pré-émulsion est forcée à passer par un orifice de très petite taille appelé tête d'homogénéisation. Elle est alors fortement comprimée, et, à la sortie du dispositif, une détente subite engendre un phénomène de cavitation. La pression se transmet ainsi à travers le fluide à la vitesse des ondes sonores, et est comprise entre 30 et 1000 bars à travers une tête d'homogénéisation. Les gradients de pression générés dans le milieu sont très transitoires, (< 1 ms en liquide) ce qui permet de considérer l'application de la pression comme homogène. Lors de l'homogénéisation des émulsions, la température au cours du procédé doit être supérieure à la température de fusion de la phase grasse afin de

permettre une bonne réduction de la taille des éléments considérés (Roustel, 2010). Aucune étude dans la littérature ne reporte l'utilisation de ces techniques pour générer des nanoparticules encapsulant des parfums. En revanche, elles sont considérées comme les principales méthodes pour générer des nanoparticules lipidiques solides. Leur utilisation sera plus particulièrement décrite dans les articles scientifiques dans la partie expérimentale.

3.2.4.1. Principe

La tête d'homogénéisation comporte trois parties : le siège, le clapet et l'anneau de choc (Figure 22). Le produit à homogénéiser entre le long de l'axe du siège, puis, est rejeté radialement et est laminé dans l'étroite lumière qui sépare le siège et le clapet (le clapet est décollé de son siège en raison de la pression du produit). Il est alors projeté à une vitesse de l'ordre 100 à 400 m.s⁻¹ sur l'anneau de choc avant d'être refoulé à l'extérieur. La contre-pression qui est ainsi créée par la lumière du clapet est maintenue, soit par un ressort puissant disposé à l'arrière du clapet, soit par un dispositif hydraulique. Compte tenu que l'action prend place dans un volume restreint, le temps de séjour dans la tête est très court, environ 3 ns. L'énergie délivrée par la pompe haute pression est convertie en énergie cinétique et une partie de cette dernière est reconvertie en pression en fin de tête d'homogénéisation et une autre partie en chaleur. Chaque tranche de pression conduit à une élévation de la température d'environ 1°C, selon l'Équation 3 (Schultz, 2004).

	$T_s = \frac{P_1 - P_s}{40} + T_e$	Équation 3
Avec T_s	température de sortie du produit (°C)	
P_1	pression d'homogénéisation (bar),	
P_s	pression de sortie du produit (bar),	
T_e	température d'entrée du produit (°C)	

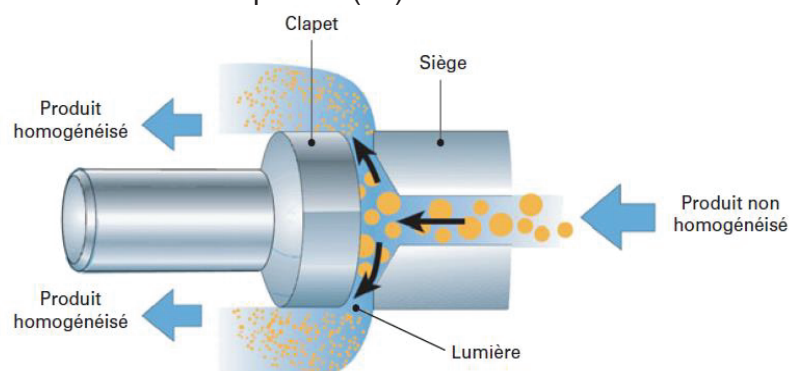


Figure 22 : Représentation de la tête d'homogénéisation et phénomènes mis en œuvre

3.2.4.2. Mécanismes mis en œuvre

Au sein de la tête d'homogénéisation, il peut y avoir des forces de cisaillement, résultant du laminage et des variations brutales de vitesse du produit. Ceci est directement

lié à la viscosité des phases en présence. Le procédé est applicable pour des rapports de viscosité entre phase dispersante et phase dispersée inférieurs à 4. Les variations de direction et l'alternance entre accélération / dé-accélération entre des micro-turbulences sont fortement dépendante de la viscosité de la phase dispersée et de la vitesse de passage de produit. Plus la vitesse est élevée, plus les globules formés seront de petites tailles. Phipps *et al.* ont établi une relation de proportionnalité entre le diamètre moyen des globules et le nombre de Reynolds (Équation 4). Les forces de cavitation s'exerçant sur le produit, reposent sur le fait que le produit est accéléré au contact de la lumière du clapet, de telle manière que la pression est alors inférieure à la pression de vapeur, induisant la formation de microbulles de vapeur pendant une fraction de seconde (Figure 23). Dès que la pression remonte, c'est-à-dire dès que le produit est ralenti, les bulles implosent et génèrent une cavitation vigoureuse. Cette dernière met les globules en vibration, divisant ceux de taille supérieure à une certaine taille critique, dépend de la viscosité et de la tension superficielle des deux phases dispersée et continue. L'implosion des bulles formées par cavitation, produit des pointes de pression selon l'Équation 5.

	$d_m = \frac{L}{v} \frac{\sigma}{\rho \gamma} + \left(\frac{1}{Re} \right)^{\frac{1}{3}}$	Équation 4
--	--	------------

Avec d_m diamètre moyen (m)
 L largeur de la fente (m)
 v vitesse d'entrée dans la fente (m.s⁻¹),
 σ tension interfaciale (N.m⁻¹)
 ρ densité de la phase continue (kg.m⁻³)
 γ viscosité cinématique de la phase continue (m².s⁻¹)
 Re nombre de Reynolds dans la fente

	$\frac{P_{max}}{P_{stat}} = \frac{(P_{stat})^{-1}}{\sum \rho g l} \left[\frac{P_{stat}(x-1)}{\sum \rho g l} + 1 \right]^{\frac{x}{(x-1)}}$	Équation 5
--	---	------------

Avec P_{max} pression maximum d'une bulle qui implose (MPa)
 P_{stat} pression statique du fluide alentour (MPa)
 $\sum \rho g l$ somme de pressions partielles des gaz au début de l'implosion (MPa)
 x exposant adiabatique des gaz

Il est montré que $\frac{P_{stat}}{\sum \rho g l} = 100$ est assez fréquent, P_{max} atteint 440 MPa. Pour obtenir ce phénomène de cavitation, il est indispensable de gérer les conditions de pression et de température au sein de la tête d'homogénéisation. Pour ce faire une contre-pression est appliquée en sortie de la zone d'homogénéisation. La chute totale de pression favorise la cavitation (Phipps, 1971).

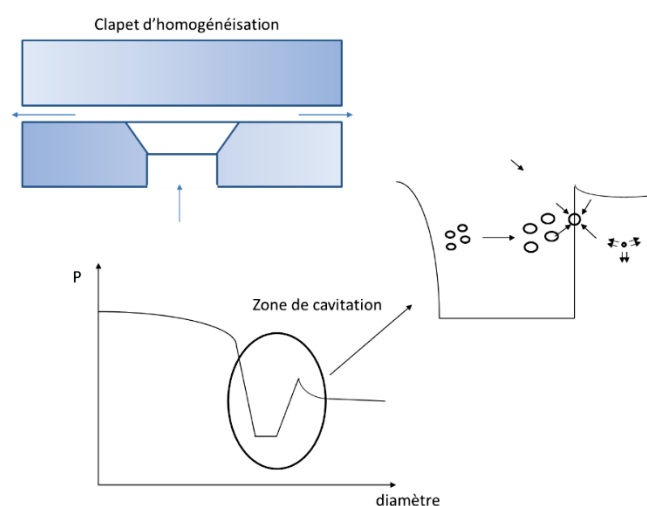


Figure 23 : Principe du phénomène de cavitation

3.3. Homogénéisation par ultrasons

Dans la littérature, il n'existe pas d'articles décrivant la génération de nanoparticules encapsulant des molécules odorantes par ce type de procédés, néanmoins, il reste très utilisé pour formuler des SLNs dans le domaine pharmaceutique. L'homogénéisation par ultrasons est basée sur la puissance d'ondes sonores dont les fréquences sont comprises entre 16 kHz et 1 MHz. Les ultrasons sont le plus généralement émis par des surfaces planes et vibrantes de façon sinusoïdale autour de sa position d'équilibre à une fréquence f et une amplitude A (de l'ordre du μm). La vitesse de propagation de l'onde va dépendre des caractéristiques du milieu, et d'une longueur d'onde λ . En milieu liquide, l'onde est considérée comme plane et longitudinale. La pression acoustique P_A ou surpression par rapport à la pression d'équilibre et l'intensité transportée par l'onde I (puissance par unité de surface) peuvent s'écrire en fonction des caractéristiques de la source et du milieu selon les Équation 6 et Équation 7.

	$P_A = AZ2\pi f$	Équation 6
--	------------------	------------

	$I = \frac{P_A^2}{2Z}$	Équation 7
--	------------------------	------------

Avec P_A pression acoustique (Pa)
 A amplitude (m)
 I puissance par unité de surface (kg/s^3)
 Z impédance acoustiques ($\text{kg/m}^2.\text{s}^1$)
 f fréquence (Hz ou s^{-1})

L'impédance acoustique Z a des valeurs très différentes suivant le milieu de propagation : $1.5 \cdot 10^6 \text{ kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dans l'eau et $410 \text{ kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dans l'air. A l'interface entre

deux milieux d'impédances acoustiques très différentes, l'onde se réfléchit et conduit à une onde stationnaire de période $\lambda/2$. A la traversée de milieux visqueux ou diphases denses, une partie de l'énergie acoustique va se dégrader en chaleur sous l'effet des frottements visqueux et l'amplitude de l'onde diminue donc avec la distance de la source. Les bulles de cavitation sont alternativement sujettes à des dilatations et à des contractions. Cependant en moyenne, leur diamètre s'accroît, ce phénomène est appelé « diffusion rectifiée ». A faible intensité acoustique, l'amplitude de variation du rayon des bulles est faible, et la durée de vie de la bulle est longue (cavitation stable). A forte intensité, le diamètre de la bulle peut atteindre plusieurs fois sa valeur d'équilibre, et la bulle implose très vite, dès le premier maximum de pression acoustique (cavitation transitoire) (Figure 24). Le rayon de résonance, qui caractérise la taille de bulle pour laquelle les amplitudes d'oscillation sont maximales, passe d'environ 100 μm pour une fréquence de 20 kHz à quelques micromètres pour de plus hautes fréquences (500 kHz). Les effets mécaniques sont favorisés à basse fréquence (Mason, 1988). Les intensités de la cavitation et de ses effets augmentent avec l'intensité acoustique, la pression extérieure, la diminution de la température et la présence de certains gaz. Deux mécanismes permettent d'expliquer l'effet des ultrasons sur l'émulsion : (i) - l'onde génère des instabilités à l'interface liquide – liquide qui vont induire la formation de gouttes ; (ii) - l'implosion des bulles de cavitation va casser les gouttes dispersées à proximité entraînant une réduction progressive du diamètre moyen de l'émulsion. Ce deuxième phénomène semble prédominant et implique que des paramètres opératoires seront ceux qui jouent sur la cavitation (Li, 1978).

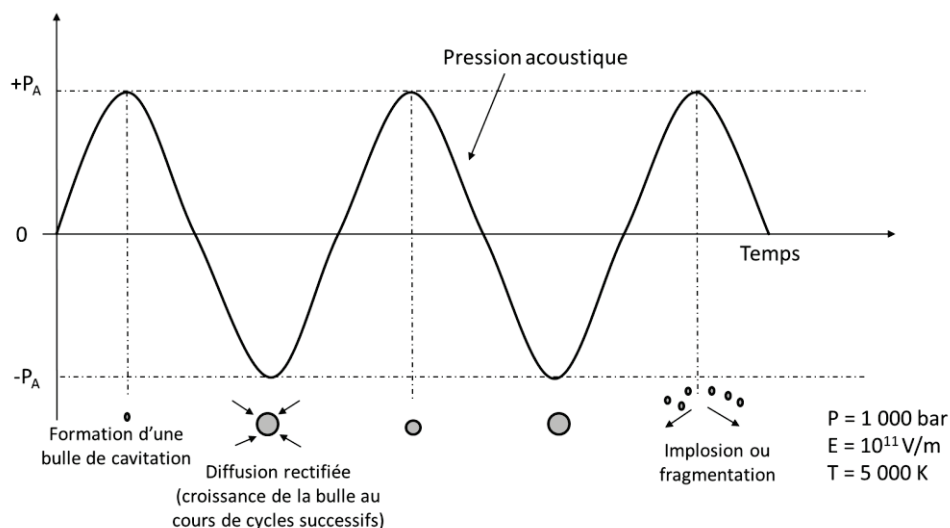


Figure 24 : Mécanisme de cavitation ultrasonore (Canselier, 2002)

Les émulsions générées possèdent une taille à l'échelle nanométrique, très stable. La quantité de tensioactifs nécessaire avec ce procédé est faible, en effet, la cavitation favoriserait la formation de charges qui s'adsorbent à l'interface et stabiliseraient

l'émulsion. Plusieurs paramètres opératoires influencent les caractéristiques de l'émulsion obtenue. Ils sont propres aux ultrasons comme l'intensité et la fréquence. En effet, une intensité minimale est nécessaire pour créer une émulsion. Il a été montré que la taille des gouttes est directement liée à la puissance dissipée par unité de volume notée $\varepsilon^{-0.4}$. Pour atteindre des échelles nanométriques, des densités de puissance électrique très élevées sont nécessaires. Il semble que les meilleurs résultats soient obtenus à basses fréquences. Le plus souvent l'augmentation de la température peut avoir un effet défavorable sur le phénomène de cavitation. Lorsque deux phases non miscibles ont une interface plane, il faut fournir beaucoup d'énergie pour réaliser l'émulsion. Ainsi, une émulsion grossière est réalisée en amont avec un autre dispositif pour diminuer la taille de la dispersion obtenue (Canselier, 2002 ; Abismaïl, 1999).

4. Conclusion

L'encapsulation de parfums suscite un grand intérêt dans plusieurs domaines industriels et notamment les industries alimentaires, cosmétiques et textiles. Il existe un vaste panel de procédés d'encapsulation qui vont induire des tailles de particules, des taux d'encapsulation, des cinétiques de libération, et des stabilités, différents. Ainsi, son choix fonction de l'application de la particule, des contraintes réglementaires liées au domaine et des propriétés des molécules odorantes à encapsuler. Sur le marché, il existe pour le moment beaucoup de microparticules odorantes protégées par un grand nombre de brevets décrivant l'utilisation du procédé de polymérisation. Malgré des efforts permettant de réduire les quantités de solvants organiques et de surfactants utilisés, la présence de monomères et oligomères mal connus et potentiellement toxiques dans le milieu réactionnel reste l'inconvénient majeur de ces techniques. Ainsi, les procédés utilisant des polymères synthétiques préformés aux propriétés définies connaissent aujourd'hui une forte expansion. Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes orientées vers ces techniques permettant de générer des particules biodégradables de faibles tailles pouvant être utilisées dans le domaine biomédicale. Souhaitant réaliser des nanoparticules encapsulant des parfums de différentes natures, polymères et lipidiques, nous nous sommes orientées vers deux techniques simples à savoir la nanoprécipitation et les procédés de gélification thermique combinée à l'utilisation de procédés d'homogénéisation. Ces nanoparticules se caractérisent également comme des vecteurs présentant un réel intérêt pour des applications cutanées.

Nanoparticules, les enjeux de l'application topique

La principale fonction de la peau est de défendre notre corps vis-à-vis de notre environnement extérieur grâce à une structure et une composition particulière ; elle est souvent caractérisée par le terme de « barrière physique ». Ce rôle est principalement attribué à l'épiderme. Néanmoins, compte tenu de l'importance de sa surface (1,8 m² environ pour un adulte de 65 kg), la peau constitue quantitativement l'organe le plus important en contact avec le milieu extérieur. Cette spécificité en fait donc une cible de choix pour le développement de traitement. De nombreuses stratégies de traitement topique ont été mises au point reposant sur des vecteurs ou des systèmes permettant de franchir cette barrière pour atteindre dans certains cas, la circulation sanguine. Cependant, peu d'agents chimiques et biologiques sont capables de pénétrer, mais les systèmes colloïdaux se sont présentés comme des outils innovants suscitant un grand intérêt pour les applications cutanées.

Afin de mieux comprendre et de déterminer avec précision, quel type de vecteurs choisir, il est intéressant de connaître le fonctionnement de la barrière épidermique, de son homéostasie et de ses mécanismes régulateurs.

1. La fonction « barrière » de la peau

La peau est constituée de trois couches tissulaires qui sont l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme, de faible épaisseur, est la couche la plus superficielle. Cet épithélium squameux, stratifié kératinisé se renouvelle continuellement à partir des cellules de la couche basale. Ce processus de différenciation conduit à la formation de la couche cornée, formant une membrane semi-perméable, prévenant des agressions extérieures. Le derme, plus épais, est la couche interne de la peau ; il est placé au-dessus de l'hypoderme, couche la plus profonde de la peau (Figure 25). L'épiderme et le derme sont séparés par la jonction dermo-épidermique. En revanche, aucune limite franche n'est observée entre le derme et l'hypoderme qui sont tous deux, des tissus conjonctifs richement vascularisés.

La pénétration cutanée d'une substance est souvent définie comme un processus en deux étapes ; la molécule est absorbée au sein de la peau, puis résorbée depuis le derme vers la circulation sanguine. Ainsi, lors de l'étude expérimentale de ces phénomènes, la pénétration dans l'hypoderme n'est pas investiguée.

Dans la peau, sont également retrouvées des cellules dendritiques de l'épiderme appelées cellules de Langerhans, ainsi que des agents de défenses cellulaires et moléculaires constituant un réseau sentinelle périphérique du système immunitaire.

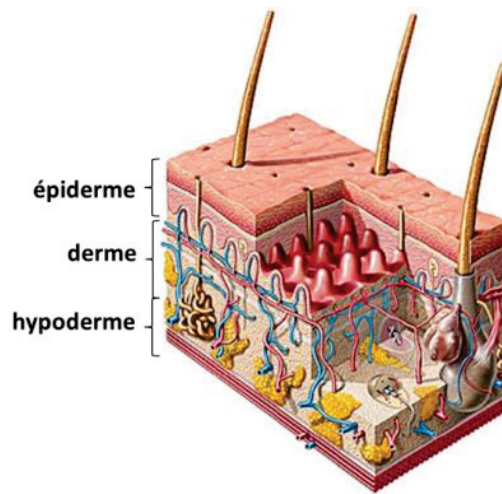


Figure 25: Représentation schématique de la peau

1.1. La couche cornée : première barrière à la pénétration cutanée

Les molécules vont dans un premier temps se heurter à la couche cornée. Elle constitue une barrière à la diffusion de l'eau et protège les tissus sous-jacents des agressions par les xénobiotiques, des radiations ultraviolettes (absorption de 70 % des UVB) et, par sa résistance à la friction, des agressions mécaniques (Dugard, 1991 ; Scheuplein, 1983). Cette assise est composée de cornéocytes, cellules mortes, entièrement kératinisées dont la perte du noyau résulte de la différenciation épidermique, empilées dans une matrice lipidique de faible perméabilité. Plusieurs assises de cellules sont juxtaposées (épaisseur variable en fonction des sites anatomiques) et reliées entre elle par des cornéodesmosomes.

De manière schématique, cette couche est représentée par un simple mur de briques (cornéocytes) jointées par du ciment (lipides) (Figure 26). Néanmoins, ce modèle simplifié ne traduit pas de la complexité du *stratum corneum* (SC). Au cours de la desquamation, les cellules sont continuellement éliminées et remplacées par les cellules d'une couche inférieure. Ce phénomène résulte de l'action de protéases, qui clivent les protéines constitutives des cornéodesmosomes, désolidarisant les cellules du réseau (Rawlings, 2005).

Outre son rôle de barrière, il transmet en permanence des messages aux couches plus internes, pour répondre au mieux aux perturbations externes telles que les changements d'humidité ambiante, des agressions solaires ou bactériennes... Localisés au sein des cornéocytes, se trouvent également les facteurs naturels d'hydratation, appelés

NMF (Natural Moisturizing Factors) qui maintiennent le degré d'hydratation de la peau à un niveau optimal. Ces molécules hydrophiles sont principalement des acides aminés, de l'acide hyaluronique, du glycérol.... L'évaporation de l'eau de la peau appelée « perte insensible en eau » se présente comme un flux hydrique résultant du phénomène de perspiration (élimination gazeuse lente) et de sudation liée à l'activité des glandes sudoripares (Rawlings, 2005).

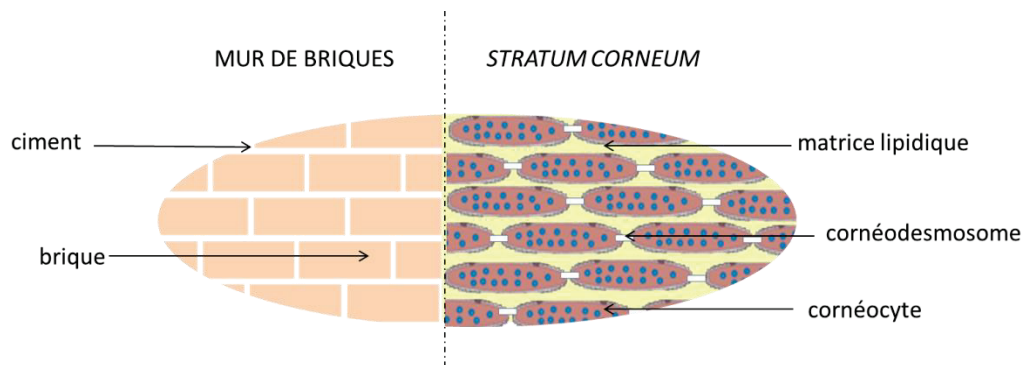


Figure 26 : Comparaison de la structure de la couche cornée et d'un mur de pierre

1.1.1. Formation de la couche cornée

Cette couche est le résultat d'une maturation progressive des kératinocytes comportant une série de modifications biochimiques et morphologiques, depuis la prolifération kératinocytaire de la couche basale de l'épiderme jusqu'à la formation de cornéocytes. Au cours de cette étape, les kératinocytes vont perdre leur noyau ainsi que d'autres organes vitaux, la membrane plasmique est transformée en une enveloppe dense et insoluble, et le cœur des kératinocytes est composé de filaments intermédiaires de kératine et de filaggrine (Markova, 1993). Les cornéocytes sont assemblés dans une matrice lipidique composée essentiellement de céramides, d'acides gras libres et de cholestérol possédant une structure bi - et tri - dimensionnelle particulière. Ces lipides résultent eux-mêmes de l'hydrolyse de leurs précurseurs (sphingomyélines, glucosylcéramides, phospholipides et, pour partie, de sulfate de cholestérol) libérés à l'interface *stratum granulosum* - *stratum corneum* en même temps que les hydrolases correspondantes (sphingomyélinases, β -glucocérébrosidase, phospholipases et cholestérol sulfatases). Cette libération dans le milieu extracellulaire se fait par exocytose de petites granules appelées, suivant les auteurs, corps d'Odland ou corps lamellaires ou kératinosomes (Freinkel, 1985 ; Redoules, 1998).

En parallèle, une monocouche d' ω -hydroxy-céramides et d' ω -hydroxy-acides gras, libérés au cours du processus de fusion entre les corps d'Odland et la membrane plasmique, vient recouvrir les cornéocytes et servir dans un second temps de sites d'ancrage aux lipides

intercornéocytaires (Behne, 2000). Ces céramides ω -hydroxylées sont liées de manière covalente, sous l'action des transglutaminases, aux motifs glutamine de certaines protéines de l'enveloppe cornée comme l'involucrine (Nemes, 1999). Les longues chaînes céramidiques et celles des acides gras libres forment avec le cholestérol des structures en bicouches stabilisées dans un environnement aqueux par des interactions de Van Der Waals et des liaisons hydrogènes. Ces structures lipidiques, localisées entre les cornéocytes, s'organisent en édifices multifeuillets, formés d'une alternance de plans lipophiles et hydrophiles, parallèles aux surfaces cellulaires (Fartasch, 1993). Les cornéodesmosomes, liant les cornéocytes, sont des structures protéiques résistantes, leur procurant l'essentiel de leur cohésion (Lundstrom, 1994).

1.1.2. Intégrité de la fonction barrière

Il dépend de trois éléments qui sont : (i) - la composition intracellulaire des cornéocytes, (ii) - la persistance des cornéodesmosomes, (iii) - l'organisation et la composition de la matrice lipidique dans les espaces intercellulaires.

Tous ces paramètres dépendent de la différenciation kératinocytaire, toute modification de ce phénomène induit des modifications de la fonction barrière (Elias, 2005).

1.2. L'épiderme « viable » : seconde couche de protection

L'épiderme viable, à la différence du *stratum corneum*, est composé de cellules fonctionnelles qui sont les kératinocytes. Ce tissu épithélial n'est irrigué par aucun vaisseau sanguin. Les cellules le composant sont donc alimentées par diffusion depuis le derme.

D'un point de vue structural, il est composé de quatre assises qui sont : la couche claire, la couche granuleuse, la couche épineuse et la couche basale. La couche claire ou *stratum lucidum*, en dessous du *stratum corneum*, est formée à partir de cellules jointives et claires sans noyau remplacé par une vacuole. Elles sont caractérisées par la présence de filaggrine. Plus en profondeur est retrouvée la couche granuleuse ou *stratum granulosum* contenant 3 ou 4 assises cellulaires présentant des grains de profillagrine ou kératohyaline. La couche épineuse appelée couche de Malpighi ou *stratum spinosum*, est composée de kératinocytes qui présentent des tonofilaments précurseurs de la kératine et de mélanocytes contenant la mélanine responsable de la pigmentation de la peau et des cellules de Langerhans (cellules de l'immunité). La couche basale ou *stratum germinativum* présente des kératinocytes reliés par des desmosomes (Figure 27).

La division cellulaire a lieu dans cette couche donnant naissance à une cellule souche (restant dans la couche basale) et une cellule qui va se différencier et migrer dans

les couches supérieures. Cette couche repose sur une lame basale et est ancrée par des fibres de réticuline (Dubus, 2000). La résistance de l'épiderme viable à la diffusion de substances extérieures, est très faible comparativement à celle de la couche cornée, mais il est cependant admis que, lorsque celle-ci est éliminée par *stripping*, l'épiderme viable puisse jouer un rôle de barrière, notamment vis-à-vis de molécules très hydrophobes.

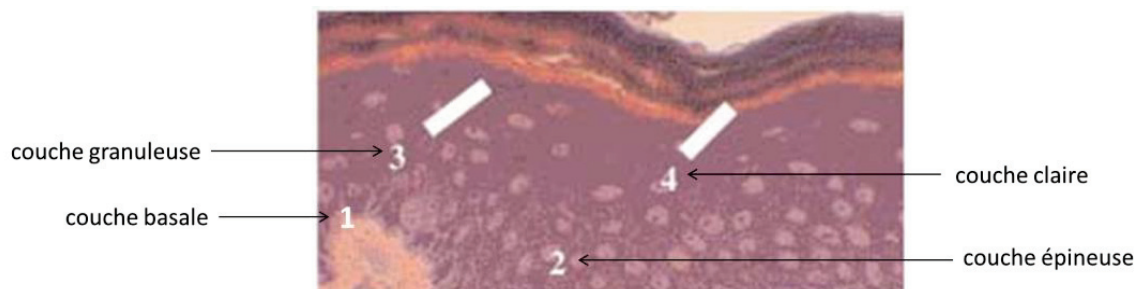


Figure 27: Coupe histologique de peau – coloration toluidine/safranine (Structure de la peau, 2005)

1.3. **Le derme : troisième couche de protection**

Le derme est un tissu conjonctif constitué de trois parties à savoir le derme papillaire jouté à la jonction dermo-épidermique, le derme réticulaire et le derme profond. Les ondulations des papilles dermiques permettent d'augmenter considérablement la surface d'échange épiderme-derme et de s'adapter aux étirements ; la présence de replis dermo-épidermiques de 0,5 à 1 µm d'épaisseur (à l'origine du réseau microdépressionnaire de surface) compense ainsi le peu d'élasticité de l'épiderme (Figure 28A & B).

Le derme est composé de diverses cellules dont les fibroblastes qui vont participer à la synthèse de macromolécules et des glycoprotéines entrant dans la constitution de la matrice extracellulaire et des cellules du système immunitaire (lymphocytes, cellules dendritiques, mastocytes et macrophages tissulaires).

Les macromolécules présentes dans le derme sont des fibres de collagène, d'élastine et de fibromectine baignant dans une sorte de gel formé par les glycosaminoglycanes captant l'eau. (Figure 28C). De plus, la présence de ces macromolécules assure la fonction de soutien : elles donnent la consistance à la peau. Le derme est largement vascularisé, assurant un rôle nutritif. Outre son rôle nutritif, le derme joue également un rôle primordial dans la thermorégulation et dans la cicatrisation ainsi que dans l'élimination de produits toxiques par la présence des annexes cutanées : poils, glandes sébacées et sudoripares (Structure de la peau, 2005). Les structures dermiques, pour une peau « non lésée », c'est-à-dire ayant préservé son intégrité, ne participent que très modestement à la fonction globale de « barrière », la vascularisation de la papille dermique favorise la résorption des molécules en provenance de l'épiderme.

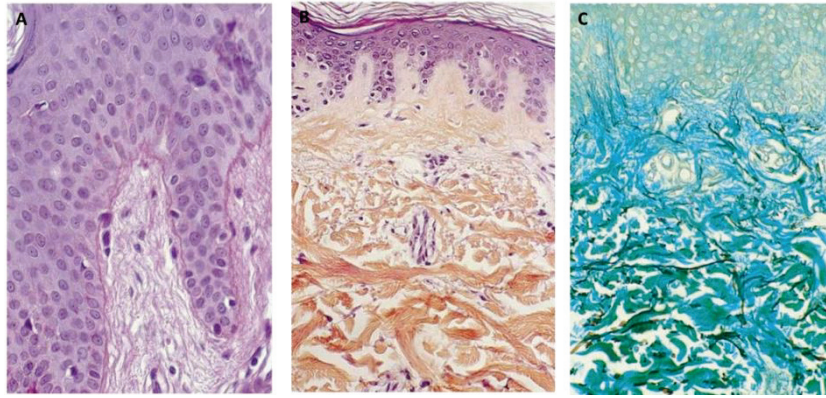


Figure 28: Coupe histologique du derme

A – Visualisation de la jonction dermo-épidermique en papilles ondulées – coloration periodic acid Schiff (PAS × 400)

B –Jonction derme papillaire (fibres lâches dispersées dans de la substance fondamentale) – derme réticulaire (tissu dense) – coloration Hématéine-Eosine-Safran (HES× 250)

C –Mise en évidence des fibres élastiques dermiques par une coloration orcéine. Fibres organisées perpendiculairement à la surface cutanée dans le derme papillaire et horizontalement dans le derme réticulaire (HES× 250) (Structure de la peau, 2005)

1.4. Une autre ligne de défense

1.4.1. Défense antibactérienne : métabolisme et mécanismes associés

Le métabolisme de la peau est estimé être égal à 2% de celui du foie. Il prévient ainsi l'internalisation bactérienne. Cette fonction est assurée par une combinaison de phénomènes. L'acidité cutanée (pH proche de 5) est un élément clé dans la protection antibactérienne. Cette acidité est due à la libération de dérivés acides au cours de la différenciation terminale comme les acides gras libres (issus principalement de l'hydrolyse des phospholipides des membranes kératinocytaires) et d'acides aminés du NMF générés par l'hydrolyse de la filaggrine (Rippke, 2002 ; Fluhr, 2004). De plus, la couche cornée est enrichie d'acides pyrrolidone carboxylique et urocanique, qui influent sur le pH cutané. La sécrétion de sueur par les glandes sudoripares, va induire la libération en surface du *stratum corneum*, d'électrolytes, (chlorure de sodium, potassium, bicarbonates), d'acide lactique, d'urée et d'ammoniac. La sécrétion sébacée, quant à elle, s'accompagne du relargage d'acides gras (Sibaud, 2008).

Ce phénomène d'acidité est complété par la présence de molécules à propriétés antimicrobiennes ou antifongiques comme les peptides antimicrobiens (β -défensines formant des pores dans les membranes des micro-organismes (Zasloff, 2002) et les cathélicidines) et les protéines antimicrobiennes (antileucoprotéases, lysozymes, RNase 7) (Schroder, 1999).

1.4.2. Défense immunitaire : véritable réseau sentinelle

Afin de protéger l'organisme, en complément de la barrière cutanée, la peau est capable de générer des réponses adaptatives en fonction des agressions extérieures (Elias, 1983 ; Elias, 2005). Cette réponse adaptative est visible par exemple lors de l'application de solvants ou de détergents sur la peau. Les lipides du SC sont alors solubilisés, pour compenser la destruction de la fonction barrière, une accélération du renouvellement épidermique est alors visible. De même, plusieurs études sur la souris ont montré que l'accroissement de la perspiration déclenche la synthèse accrue des lipides constitutifs des espaces intercornéocytaires, pour limiter la perte insensible en eau (Feingold, 1991 ; De Jongh, 2005). Il existe dans la peau, un véritable réseau du système immunitaire qui assure une réponse face à l'introduction de pathogènes dans la peau. Les cellules dendritiques et les kératinocytes vivant au contact des microbes ou de leurs toxines reconnaissent des motifs moléculaires appelés PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) *via* des récepteurs membranaires appelés « toll-like receptors ». Elles vont alors déclencher un signal danger entraînant une synthèse immédiate de cytokines inflammatoires, lesquelles induisent la synthèse de peptides antimicrobiens comme les β -défensines (HBD-2, HBD-3), la RNase 7 ou la cathélicidine LL-37. Des concentrations élevées d'HBD-2 sont par exemple retrouvées dans les squames des lésions inflammatoires psoriasiques alors que ce peptide n'est pas isolé chez des sujets sains (Howell, 2007). Ces mécanismes seront détaillés en détail dans le chapitre suivant portant sur l'eczéma allergique de contact.

Ainsi, il existe un véritable système adaptatif dans la peau qui permet de préserver son équilibre pour pallier aux changements environnementaux et faire face aux agressions extérieures. Le passage d'une simple lésion réversible à un état pathologique correspond à une rupture durable de cet équilibre.

2. Processus de l'absorption cutanée

Néanmoins, cette fonction barrière « protectrice » n'est pas absolue et les molécules chimiques vont tout de même pénétrer au travers de la peau. Elles vont emprunter deux voies différentes fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (masse moléculaire, caractère lipophile ou hydrophile, capacité de fixation aux protéines du soi...). Il s'agit de la voie transépidermique et de la voie par les annexes cutanées (Figure 29). Le plus souvent, la pénétration cutanée est la résultante de ces deux modes de pénétration. Le degré de perméabilité varie non seulement en fonction de la molécule étudiée mais également en fonction de l'état physiologique de la peau (normale, lésée, pathologique...), et des véhicules dans lesquels sont introduites ces molécules avant application.

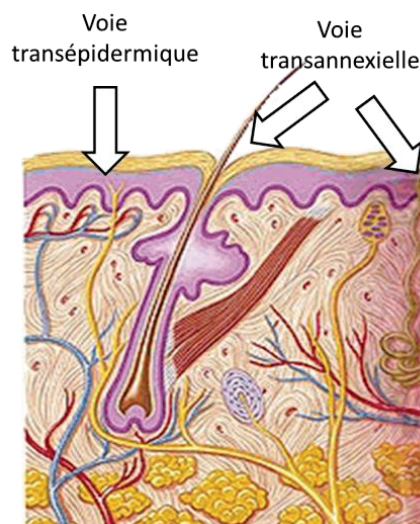


Figure 29: Représentation des deux voies de passages à travers la peau

L'absorption cutanée correspond au passage d'une substance depuis le milieu extérieur jusqu'au sang. Elle est liée à deux processus successifs : dans un premier temps, les molécules pénètrent dans la peau, dans un second temps, elles peuvent être résorbées *via* les vaisseaux sanguins ou lymphatiques dans le derme papillaire puis le derme profond. La pénétration correspond à une diffusion passive sans apport d'énergie spécifique à travers les différentes couches cutanées (*stratum corneum*, épiderme viable, derme) et les annexes cutanées (follicules pileux, glandes sudoripares). Une fois absorbée après passage à travers les assises de la peau, la substance est distribuée dans l'organisme par voie circulatoire puis, après avoir été ou non métabolisée, elle est éliminée ou stockée. La résorption cutanée est influencée par le flux sanguin retrouvé dans le derme. Celui-ci est souvent insuffisant pour résorber les produits, et une rétention locale au niveau du derme profond et une diffusion lente à partir de cette zone sont souvent observées notamment pour de nombreuses substances tels que des stéroïdes (estradiol, progestérone, dexaméthasone), des toxiques organophosphorés (malathion, parathion, disopropyl fluorophosphate), des anti-inflammatoires non stéroïdiens (indométacine, acide flufénamique, dérivés salicylés, kétoprofène, diclofénac) (Laforge, 2007).

2.1. Les voies de pénétration

2.1.1. La pénétration transépidermique

La majorité de la surface cutanée est occupée par la couche cornée, les annexes cutanées n'occupent qu'une faible surface. Les densités de follicules pilosébacés et des glandes sudoripares éccrines varient en fonction des sites anatomiques, elles sont ainsi évaluées entre 400 à 600 / cm² pour les follicules pilosébacés, et 120 à 620 / cm² pour les glandes sudoripares. Dans ces conditions, la perméabilité de la peau repose principalement

sur la structure chimique de la couche cornée et son organisation structurale (Laforgue, 2007). Deux voies distinctes sont possibles : les molécules peuvent pénétrer à travers les espaces intercellulaires de la couche cornée (voie intercellulaire) ou pénétrer directement dans les cornéocytes (voie intracellulaire) (Schaefer, 1996) (Figure 30).

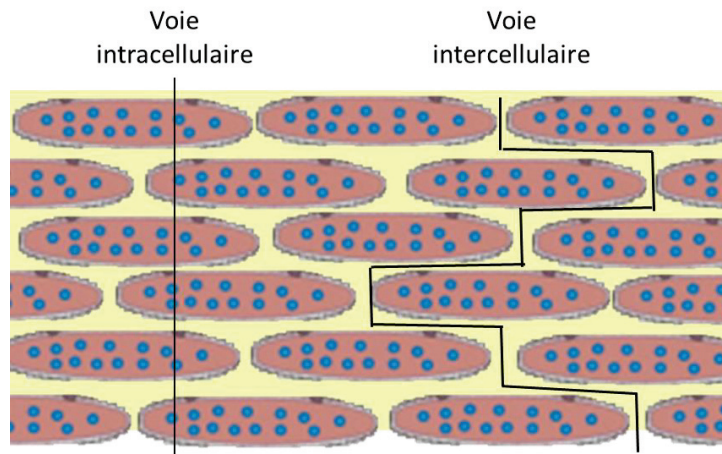


Figure 30: Représentation des deux voies de passages transépidermiques

La pénétration *via* la voie intracellulaire a souvent été considérée comme la voie majoritaire compte tenu de la faible surface relative des espaces intercellulaires (5% de la couche cornée). De par sa morphologie en structure jointive, la couche cornée va également limiter la pénétration intercellulaire. En effet, elle est composée de 15 couches de cornéocytes (de diamètre 40 μm ; épaisseur de 0.3 à 0.8 μm) espacées de 75 nm. Ces derniers sont considérés comme hexagonaux et organisés en cluster de 12 cornéocytes. Chaque cluster est séparé par des frontières de quelques micromètres, qui sont observées en surface comme des sillons (Schaefer, 1996 ; Potts, 1991). Ainsi, dans les stratégies de traitement par application topique, des promoteurs de l'absorption cutanée sont utilisés afin de déstabiliser cette structure. Ce sont principalement des solvants organiques (diméthylsulfoxyde, diméthylacétamide, diméthylformamide, éthanol...) et des tensioactifs (lauryl sulfate de sodium). Ces substances, par leur action sur la kératine déstabilisent l'enveloppe membranaire des cornéocytes (Laforgue, 2007), elles ont aussi une action de fluidification voire de solubilisation des lipides.

La pénétration à travers les espaces intercornéocytaires est spécifique aux molécules de faibles tailles pouvant passer dans l'espace intercornéocyttaire variant de 6 à 13 nm. De plus, l'orientation en bicouche des lipides cutanés sépare des zones lipophiles et hydrophiles (Schaefer, 1996). Les variations du type et de la quantité de lipides intercornéocytaires provoquent également des organisations spatiales différentes. 80% des lipides sont non polaires et l'hydrophilie de leur « tête » est due à un groupement hydroxyle, permettant ainsi la formation de liaison hydrogène avec les lipides adjacents ou des molécules d'eau et

l'obtention de conformations spatiales différentes. Ces lipides sont alors organisés en clusters orthorhombiques dans les couches les plus profondes, formant des zones très rigides et compactes (

Figure 31A). La pénétration du sébum en surface va provoquer une modification de la structure par dégradation des cornéodesmosomes, un assemblage hexagonal est essentiellement retrouvé, entraînant un espacement plus grand rendant la perméabilité plus facile. Cette zone est alors moins compacte (

Figure 31B). Ainsi, la région apolaire correspondante à la queue des lipides constitue la voie d'absorption des molécules hydrophobes tandis que les molécules hydrophiles empruntent les pores aqueux de diamètres compris entre 0.4 et 36 nm (Boncheva, 2008 ; Damien, 2010). L'utilisation de détergents, considérée comme promoteur de l'absorption cutanée, peut désorganiser la structure, les lipides possèdent alors une plus grande fluidité (forme gel), induisant une augmentation de la perméabilité cutanée (

Figure 31C).

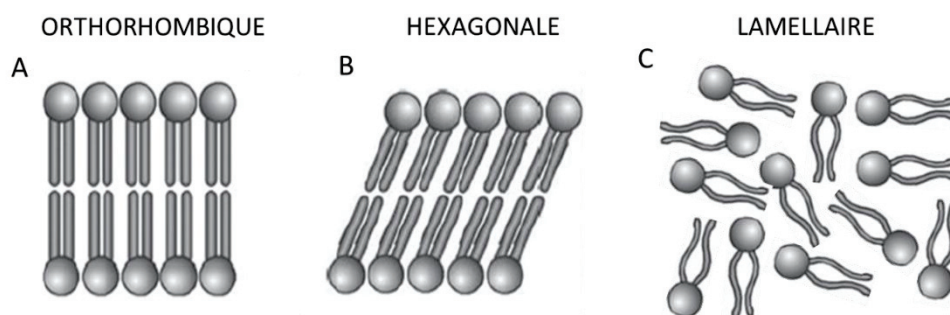


Figure 31: Etat cristallin adopté par les lipides cutanés – représentation schématique

En dépit de cette structure représentant une véritable défense contre les agents extérieurs, les canaux sudoripares et les unités pilosébacées constituent également des voies d'entrée dans la peau.

2.1.2. La pénétration via les annexes cutanées

La couche cornée est traversée par les follicules pilosébacés et les glandes sudoripares. Ces structures offrent des zones de moindre résistance pour la pénétration des molécules, elles sont qualifiées de voie de shunt. Ainsi, il s'agit de la voie de pénétration des ions, des molécules de grosses tailles, des électrolytes, des molécules très polaires et également des particules (Boudry, 2008).

2.1.2.1. La pénétration via les glandes sudoripares

Ces glandes sont responsables de la sécrétion de sueur. Elles participent au maintien de la température de l'organisme et l'excrétion d'acides et de déchets grâce au phénomène de transpiration. Il existe deux types de glandes sudoripares : les glandes éccrines et apocrines. Les glandes éccrines dites exocrines possèdent une structure tubulaire de 2 à 5 mm de long. Leur base pelotonnée (glomérules) est ancrée dans le derme (Figure 32). Elles sont revêtues de trois types cellulaires tels que les cellules claires riches en glycogène, les cellules sombres riches en ribosomes et les cellules myoépithéliales assurant en périphérie l'évacuation de la sueur. Les glandes apocrines sont plus volumineuses et sont retrouvées au niveau du derme profond. Leur structure est similaire aux glandes éccrines, mais leur canal excréteur large débouche dans le follicule pileux (Dubus, 2000 ; Weather, 2001).

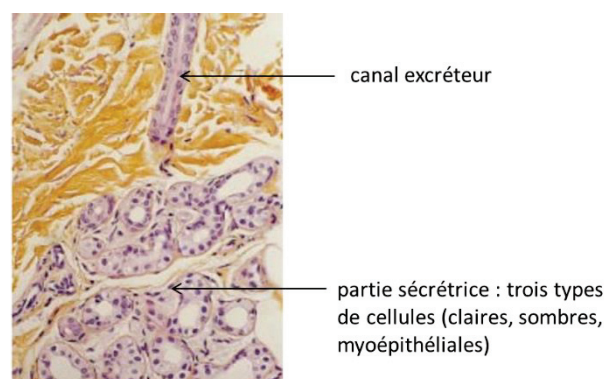


Figure 32 : Coupe transversale dermique d'une glande éccrine (HES 400)

La diffusion des particules au sein de ces structures reste difficile à évaluer. En effet, en absence de sudation leur conduit est pratiquement obturé. De ce fait, leur rôle comme voie de pénétration est contesté. Elles pourraient intervenir néanmoins dans le mécanisme de diffusion des électrolytes et des formes ionisées pour les molécules ionisables, dans le cadre d'une administration percutanée assistée par le courant électrique (ionophorèse) (Guy, 2001). Dans ces conditions, les « pores hydrophiles » qu'elles constituent deviendraient des chemins de passage importants pour les produits hydrosolubles (Laforgue, 2007).

2.1.2.2. La pénétration via les follicules pilosébacés

2.1.2.2.1. Structure des follicules pilo-sébacés

Le follicule pileux renferme le poil dont la partie émergente à la surface est appelée tige pileuse et la partie interne est nommée racine. Les poils sont une caractéristique propre des mammifères. Leur couleur, leur taille et leur répartition sont variables en fonction de la race, de l'âge, du sexe et de la région du corps. Seules les paumes, les plantes et les dermo-muqueuses buccales et génitales en sont dépourvues (Dubus, 2000). Les poils présentent une partie visible, ou tige, en continuité avec la racine du poil enfoncée obliquement dans la peau. Ils sont caractérisés par trois couches de cellules kératinisées : la cuticule, la corticale

et la moelle. La cuticule (ou épidermicule), externe, est formée de cellules aplaties, superposées à la manière des tuiles d'un toit. La corticale est constituée de cellules fusiformes scellées les unes aux autres, kératinisées et pigmentées. La kératine pilaire, organisée selon l'axe longitudinal du poil, est une kératine dure, compacte et résistante. La moelle centrale est constituée de une à deux rangées de cellules qui dégénèrent pour laisser place à de larges vacuoles remplies d'air et de pigments. Cette structure est composée de cinq parties possédant des caractéristiques distinctes à savoir l'*infundibulum*, l'isthme, le bulbe et la papille dermique, la glande sébacée et le muscle pilo-arrecteur (Figure 33) (Geras, 1990).

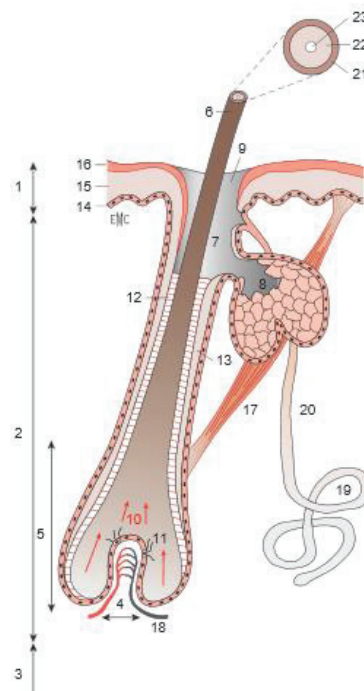


Figure 33: Représentation schématique d'un follicule pilosébacé. 1. Épiderme ; 2. Derme ; 3. Hypoderme ; 4. Papille ; 5. Bulbe pilaire ; 6. Tige du poil ; 7. *Infundibulum* pilaire ; 8. Glande sébacée ; 9. Orifice pilosébacé ; 10. Matrice du poil ; 11. Mélanocytes de la racine ; 12. Gaine épithéliale interne ; 13. Gaine épithéliale externe ; 14. Couche germinative ; 15. Couche de Malpighi ; 16. Couche cornée ; 17. Muscle arrecteur du poil ; 18. Vaisseaux sanguins ; 19. Glande sudoripare

➤ L'*infundibulum*

Cette partie ne présente aucune variation au cours du cycle pilaire. Cette région se situe entre la surface de la peau et l'abouchement du canal sébacé. La partie distale appelée *acro-infundibulum* possède une structure identique au SC, tandis que la partie proximale appelée *infra-infundibulum* est constituée d'un épithélium kératinisé mais sans couche granuleuse. La couche kératinisée de surface est fine et formée de cellules peu adhérentes entre elles à l'état normal ; si la kératinisation et l'adhérence des cellules augmentent alors il y a formation de bouchons appelés comédons (Dubus, 2000 ; Geras, 1990).

➤ L'isthme

Il s'étend de l'abouchement du canal infundibulaire jusqu'au point d'insertion du muscle pilo-arrecteur appelé région du bulbe. Cette zone renflée située dans la gaine épithéliale externe, contient des cellules souches essentielles au renouvellement du follicule pileux (Dubus, 2000 ; Geras, 1990).

➤ Le bulbe et la papille dermique

Le bulbe pileux est un sac cylindrique correspondant à la partie la plus profonde. Il est caractérisé par deux parties distinctes.

Il est creusé d'une cavité occupée par le tissu conjonctif très vascularisé appelée papille folliculaire. Elle assure la liaison avec le reste de l'organisme. En effet, les nombreux vaisseaux sanguins irriguant tous les sites du follicule passent par cette zone et vont communiquer les messages génétiques et hormonaux ainsi que les éléments nutritionnels (Dubus, 2000 ; Geras, 1990).

Le bulbe comprend également une seconde zone qualifiée de matricielle. Elle est constituée d'un amas de cellules peu différenciées. La forte activité mitotique alimente la croissance des compartiments concentriques supérieurs. Au-dessus de cet espace, appelé « Ligne Auber », les cellules se différencient pour former les gaines épithéliales internes et externes de la tige pileuse. Les kératinocytes et les mélanocytes sont retrouvés dans cette zone, la kératine apportant au poil sa structure tandis que la mélanine lui apporte sa couleur. Les cellules issues de la matrice sont progressivement repoussées vers le haut et se kératinisent pour former la racine puis la tige du poil (Figure 34). La région dite transitoire va subir de nombreuses modifications au cours du cycle pileux (Dubus, 2000 ; Geras, 1990).



Figure 34: Coupe transversale du follicule pileux (HES 100) (Dubus, 2000)

➤ Les glandes sébacées

Cette glande est abouchée sur le versant postérieur du follicule par le canal sébacé. Il s'agit d'une glande multilobée à sécrétion holocrine. Elle contient des cellules appelées sébocytes subissant une différenciation de la périphérie de la glande vers son centre. Elles se remplissent de sébum (mélange fongistatique et bactériostatique composé essentiellement de cires, triglycérides, de scalène, d'acides gras et de cholestérol) avant de se rompre et de se desquamer (Dubus, 2000 ; Geras, 1990).

➤ Le muscle pilo-arrecteur

Ce muscle lisse et oblique porte le nom muscle horripilateur. Il longe la face externe de la glande sébacée et s'insère sur la lame basale du follicule pileux et à la lame basale de la jonction dermo-épidermique. Ce muscle est innervé par le système nerveux sympathique. Sa contraction, induite par le froid ou la peur, entraîne le redressement du poil (phénomène de la « chair de poule ») (Dubus, 2000 ; Geras, 1990).

➤ Le cycle pilaire

La formation des poils n'est pas continue dans le temps. Périodiquement les poils passent par une période de repos pendant laquelle la vieille tige pilaire s'élimine pour laisser place au poil qui repousse. Ce cycle comporte trois phases :

- la phase anagène correspond à la phase de croissance, les follicules s'enfoncent profondément dans le derme ou l'hypoderme dans le cas des cheveux. L'activité mitotique de la matrice permet la croissance du poil de quelques dixièmes de millimètre par jour.
- la phase catagène est courte, 3 semaines en moyenne ; l'activité mitotique de la matrice cesse et la partie profonde du follicule semble se résorber jusqu'à la hauteur du bulbe, laissant derrière une petite traînée de cellules matricielles et de fibroblastes de la papille.
- la phase télogène ou de repos, est caractérisée par l'absence de papilles dermiques. Le bulbe continue lentement son ascension jusqu'à ce qu'il atteigne l'*infundibulum* pilaire qui détermine la chute spontanée du poil. En même temps, un nouveau bourgeon pilaire apparaît et vient au contact de la papille dermique restée au-dessous, permettant la formation d'une nouvelle tige pilaire (Dubus, 2000).

2.1.2.2.2. Les différents types de follicules pilo-sébacés

La distribution des follicules pileux à la surface de la peau est variable en fonction des zones. Certaines régions en sont totalement dépourvues, comme les paumes des mains, les

plantas des pieds, les faces latérales des doigts et des orteils, le gland et le prépuce, les petites lèvres et la face interne des grandes lèvres. Deux types de follicules ont été décrits en fonction de la taille du poil et du volume de la glande sébacée, ce sont les follicules dits « terminaux » et les follicules dits « velus » (Klinger, 2007).

➤ Les follicules dits « terminaux » (THF)

Ces follicules sont retrouvés au niveau des régions pubiennes et axillaires, des cheveux, des cils et des sourcils et au niveau de la barbe chez les hommes. Les poils sont drus, épais (diamètre supérieur à $> 60 \mu\text{m}$), longs ($> 2 \text{ cm}$), et profondément implantés dans l'hypoderme. La glande sébacée est peu développée et le poil pigmenté occupe toute la largeur de l'*infundibulum* (Tableau 1) (Prost-Squarcioni, 2006).

➤ Les follicules dits « lanugineux » ou « velus » (VHF)

Ces poils sont situés sur le corps et les membres, ils sont considérés comme de petits follicules pileux. Ils sont fins ($< 30 \mu\text{m}$), modérément longs ($< 2 \text{ cm}$), peu pigmentés et dépourvus de cavité médullaire. Ils sont implantés dans le derme. Leurs glandes sébacées sont très développées et sont productrices du sébum de la peau (Tableau 5) (Prost-Squarcioni, 2006 ; Blume-Peytavi, 2010).

Tableau 5 : Caractérisation des follicules pileux chez l'adulte, THF (cuir chevelu) et VHF (région rétroauriculaire) (Knorr, 2009 ; Vogt, 2007)

	THF	VHF
Longueur du follicule pileux (μm)	3864 ± 605	646 ± 140
Longueur de l'<i>infundibulum</i> (μm)	580 ± 84	225 ± 34
Position de la région du bulbe (μm)	1191 ± 23	362 ± 88
Longueur de la région du bulbe (μm)	240 ± 52	91 ± 27

Certains follicules sont dans une phase intermédiaire entre terminaux et velus, ils sont alors qualifiés de follicules intermédiaires.

➤ Les follicules dits sébacés

Ils sont retrouvés au niveau du visage et du haut du tronc. Ils sont peu abondants et sont caractérisés par un *infundibulum* très profond, traversé par un petit poil insignifiant. Les glandes sébacées sont nombreuses, larges et très développées et remplissent l'*infundibulum* de sébum, de lamelles cornées et de bactéries qui constituent le « filament séborrhéique » (Prost-Squarcioni, 2006).

2.1.2.2.3. La pénétration transfolliculaire

Il a été montré que le passage *via* le follicule pileux peut être rapide mais avec une quantité faible de substances transportées, alors que le passage *via* le *stratum corneum* est plus lent mais avec une quantité de substance plus importante (Scheuplein, 1976). Le follicule pileux constitue une rupture du SC due à l'ultrastructure de l'épithélium folliculaire, notamment au niveau de l'*infundibulum*. Dans cette région, l'épithélium est considéré comme perméable. Les substances pénètrent et peuvent être stockées jusqu'à 10 jours. Par comparaison, lorsqu'une substance est appliquée sur la peau, elle est principalement retrouvée dans les cornéocytes et dans l'espace intercellulaire, elle est alors rapidement éliminée (< 5 jours) par desquamation, ou par contact avec les textiles ou lors de lavage de la peau. La déplétion des substances pénétrant le follicule pileux, se produit à travers le cycle de croissance du poil et le processus de production et de flux de sébum, processus lent comparé au processus de desquamation de la couche cornée. (Lademann, 2001 ; Schaefer, 2001). Une fois dans le follicule pileux, il existe plusieurs possibilités. Premièrement, la substance pénètre dans le réservoir folliculaire mais ne traverse pas la barrière cutanée, elle reste stockée. Deuxièmement, la substance pénètre à travers la barrière cutanée et atteint le tissu viable et les cellules à compétence immune. Troisièmement, la substance traverse la barrière cutanée et atteint le système sanguin (Meidan, 2005 ; Lauer, 1995).

2.2. Modélisation mathématique de la pénétration cutanée

En considérant le métabolisme cutané inactif, et aucune fixation aux structures cutanées, la pénétration des composés au sein de la couche cornée ou des follicules pileux s'effectue par diffusion passive. La cinétique peut être représentée par la loi de Fick selon les équations Équation 8 et Équation 9. Pour appliquer cette loi, le coefficient de diffusion du composé est considéré comme constant dans la peau.

	$\frac{dQ}{dt} = K_p \times S \times (C_1 - C_2)$	Équation 8
Avec $\frac{dQ}{dt}$:	flux de diffusion (quantité par unité de temps g.s ⁻¹)	
K_p :	constante de perméabilité (m.s ⁻¹)	
S :	surface de contact de la substance avec la peau (m ²)	
C_1 :	concentration de la substance dans le compartiment donneur (g.m ³)	
C_2 :	concentration de la substance dans le compartiment receveur (g.m ³)	

	$K_p = \frac{K_m \times D_m}{E_m}$	Équation 9
--	------------------------------------	------------

Avec K_m : coefficient de partage de la molécule entre les deux milieux en contact

D_m : constante de diffusion de la substance dans la membrane

E_m : Chemin de diffusion

La loi de Fick permet de représenter les transferts de molécules entre chacune des couches de la peau, elle s'applique pour le passage de la surface de la peau au SC, du SC à l'épiderme viable, de l'épiderme au derme, du derme à l'hypoderme ou du SC au follicule pilo-sébacé, du follicule pilo-sébacé au derme... (Figure 35). Les molécules se diffusent selon un gradient de concentration qui dépend principalement de leur coefficient de partage entre les deux milieux et de son coefficient de diffusion. Théoriquement, le coefficient de partage est le rapport des activités chimiques entre les deux phases, en milieu dilué, l'activité chimique est assimilée à la concentration (Équation 10). En solution diluée, D peut être calculé en utilisant l'équation de Stokes-Einstein (Équation 11). D'après cette équation, plus le rayon du composé est petit, plus la diffusion à travers le tissu est grande. La couche cornée présente la barrière superficielle de la peau et présente une plus grande résistance par rapport aux follicules pilo-sébacés. L'épiderme viable et le derme se présentent comme une barrière seulement pour les molécules particulièrement hydrophobes (Laforgue, 2007 ; Barry, 1999 ; Klinger, 2007).

	$K_m = \frac{C_A}{C_B}$	Équation 10
--	-------------------------	-------------

Avec K_m : coefficient de partage de la molécule entre les deux milieux en contact

C_A : concentration de la molécule dans le milieu A

C_B : concentration de la molécule dans le milieu B

	$D = \frac{kT}{6\pi\eta r}$	Équation 11
--	-----------------------------	-------------

Avec k : constante de Boltzmann

T : température absolue

η : viscosité de la peau

r : rayon du composé

La couche cornée se présente comme la barrière superficielle de la peau et offre une plus grande résistance par rapport aux follicules pilo-sébacés. L'épiderme viable et le derme se présentent comme une barrière seulement pour les molécules particulièrement hydrophobes (Laforgue, 2007 ; Barry, 1999 ; Klinger, 2007).

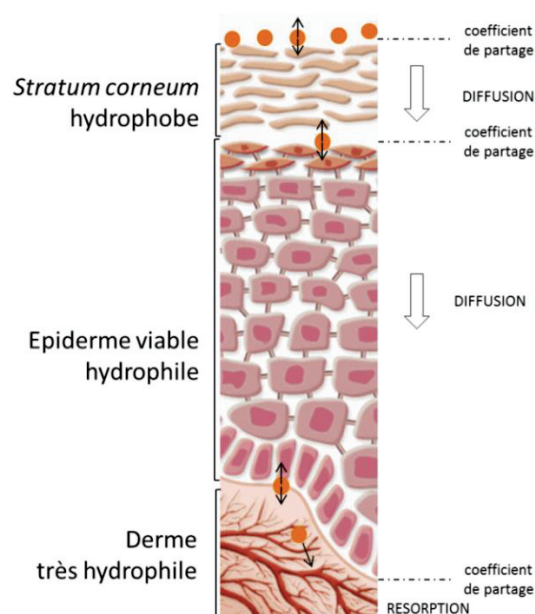


Figure 35 : Représentation schématique des mécanismes intervenant lors de la pénétration cutanée d'un composé.
Mise en évidence des zones d'échange.

2.3. Facteurs influençant la pénétration cutanée

La pénétration cutanée est modulée par plusieurs facteurs relatifs au composé appliqué, au type de formulation, aux conditions d'application, et au site d'application (Tableau 6) (Piérard, 2003).

Tableau 6 : Facteurs principaux influençant la pénétration cutanée

	Paramètres modulant la pénétration
Composé	<ul style="list-style-type: none"> - Taille et poids moléculaire - Coefficient de partage eau / lipides - Ionisation en fonction du pH (gradient de pH cutané) - Concentration appliquée - Solubilité
Formulation	<ul style="list-style-type: none"> - Type de formulation : gel, solution, crème... - Excipients utilisés (présence de promoteur d'absorption) - pH
Conditions d'application	<ul style="list-style-type: none"> - Température - Humidité - Occlusion - Durée de contact - Dose par unité de surface - Surface de peau exposée
Site d'application	<ul style="list-style-type: none"> - Type de peau (race, âge, sexe) - Zone (cheveux, front, bras...) - Hydratation de la peau - Présence de lésions - Métabolisme - Vitesse de desquamation

L'étude de l'impact de ces différents facteurs a permis de mettre en évidence des conditions optimales pour favoriser la pénétration cutanée : (i) – un coefficient de partage adapté compris entre -1 et 4 ; (ii) - un point de fusion en dessous de 200°C ; (iii) - un poids moléculaire inférieur à 500 g.mol⁻¹ (Benson, 2005 ; Magnusson, 2004).


Ces paramètres ont ainsi été définis pour des molécules libres. L'encapsulation de la molécule au sein de particules (microparticules, liposomes, nanoparticules) va modifier le profil de pénétration cutanée. La pénétration de ce type de vecteurs sera détaillée plus spécifiquement dans le paragraphe 4.

2.4. Les modèles d'étude de la pénétration cutanée

L'évaluation de la pénétration cutanée peut être réalisée par différentes méthodes (Tableau 7). Le choix de la méthode employée sera fonction du type d'études réalisées, des protocoles envisagés et de la précision des résultats attendus. L'étude *in vivo* sur l'homme reste l'expérimentation idéale, néanmoins elle est très réglementée et difficile à mettre en place. Ainsi, pour pallier ce problème réglementaire et éthique, des essais *in vitro* sur des échantillons de peaux humaines ou animales ont été développés ainsi que des études *in vivo* sur l'animal. Néanmoins, avec la mise en application du nouveau Règlement cosmétique en 2013 (Règlement européen n°1223/2009), empêchant l'expérimentation animale pour le développement de nouveaux produits cosmétiques, des modèles de peau reconstruite ont également été développés pour substituer les explants de peau d'origine animale dont certains sont industrialisés (Roguet, 2002 ; Boyce, 1988 ; Shahabeddin, 1990 ; Kùchler, 2013).

Ils sont cependant encore inadaptés à l'évaluation de la pénétration, en raison d'une fonction barrière incomplète et donc une perméabilité très supérieure à celle de la peau (Zuang, 2002 ; Groen, 2008).

Tableau 7: Méthodes utilisées pour déterminer la pénétration cutanée

Niveau de confiance	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In silico</i>
Fort  Faible	Homme Primate Porc Cobaye Rat Lapin Souris	Peau perfusée Peau en survie Peau non viable Peau reconstruite Tranches de kératomes Couche cornée	Membrane artificielle Modèle mathématique basé sur l'utilisation de la loi de Fick (Guy, 1989)

Deux protocoles permettant de déterminer l'absorption transépidermique par des méthodes *in vitro* et *in vivo* ont été mis en place par l'organisation pour la coopération économique et le développement (OCDE). Les méthodes *in vivo* doivent être conduites selon le protocole OECD TG 427 et les méthodes *in vitro* selon le protocole OCDE TG 428 mis en place en 2004.

2.4.1. Les méthodes *in vitro*

Selon les recommandations de l'OCDE, la pénétration d'une molécule chimique peut être réalisée à partir d'explants de peau de nombreuses espèces mammifères incluant la peau humaine. Les propriétés de perméabilité de la peau étant maintenues après l'excision en raison de la présence du *stratum corneum*. Au-delà de 24h, cette méthode ne permet plus de déterminer les capacités de métabolisation de la peau bien qu'elles puissent affecter fortement la nature du composé pénétrant jusqu'à la circulation sanguine.

Les méthodes *in vitro* mesurent la diffusion d'une substance à travers un explant de peau humaine ou animale, jusqu'à un réservoir de fluide.

Deux types de peau peuvent être utilisées, les peaux fraîchement excisées (<24h) dites viables (métabolisme actif & viabilité cellulaire), et les peaux non-viables, (peaux préparées et congelées) permettant de mesurer uniquement la diffusion passive de la molécule étudiée (Bronaugh, 1991 ; OECD, 2004). La peau de porc restait le modèle le plus adapté pour mimer la pénétration cutanée humaine. Ces deux mammifères possèdent des structures proches en termes d'épaisseur, de morphologie (densité pileuse et présence de glandes sudoripares) et de composition (composition lipidique du *stratum corneum*) (Meyer, 1978 ; Simon, 2000) (Tableau 8 & Tableau 9).

Tableau 8: Similitudes et divergences entre la peau de porc et la peau humaine

SIMILITUDES	DIVERGENCES
<ul style="list-style-type: none"> - Structure et composition du SC et du derme - Présence de glandes sudorales - Structure du follicule pileux - Présence de glandes sébacées - Présence de glandes sudorales dans le derme, connexion à la surface de la peau <i>via</i> un canal sudoral 	<ul style="list-style-type: none"> - Epaisseur du <i>stratum corneum</i> selon le site anatomique étudié - Faible vascularisation - Absence de glandes éccrines chez le porc

Tableau 9 : Comparaison des épaisseurs des différentes assises cutanées chez l'Homme et le porc (Bronaugh, 1982)

Epaisseur flanc de porc (µm)			Epaisseur abdomen humain (µm)		
<i>Stratum corneum</i>	Epiderme viable	Peau	<i>Stratum corneum</i>	Epiderme viable	Peau
26	66	3400	17	47	3000

2.4.1.1. Description de la méthode

2.4.1.1.1. Cellules de diffusion

Les essais sont réalisés à partir de cellules de diffusion qui sont composées d'un compartiment donneur et d'un compartiment receveur entre lesquels une membrane synthétique ou biologique est placée. Ces dernières sont réalisées en matériau inerte comme le verre pour éviter les interférences avec le système étudié. Deux types de cellules de diffusion sont disponibles : les cellules de diffusion statique ou les cellules de diffusion dynamique. Les cellules de diffusion statique portent le nom de cellules de Franz (Franz, 1975), du nom de leur créateur (Figure 36). Généralement, le compartiment donneur n'est pas placé sous occlusion durant le test d'application d'une dose définie, mais dans le cas d'application de dose infinie ou dans certains cas, la substance est appliquée sous occlusion.

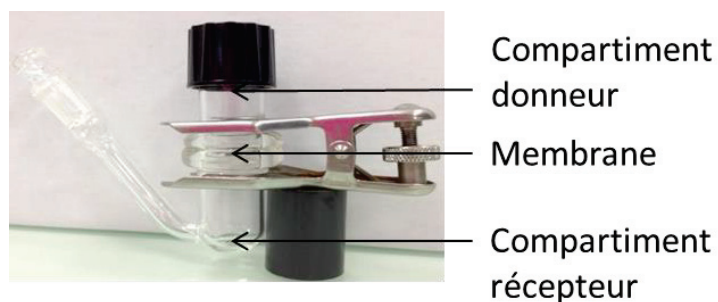


Figure 36 : Photographie d'une cellule de Franz de conception classique

2.4.1.1.2. Le liquide récepteur

Le compartiment receveur contient un liquide « récepteur » dont le rôle est de maintenir la viabilité et l'intégrité morphologique de la peau pendant la durée de l'expérience. Ce milieu doit également permettre de solubiliser la substance étudiée pour ne pas limiter la diffusion des molécules à travers la peau. Généralement, il s'agit d'un sérum physiologique ; cependant, il est essentiel que ce fluide ne freine pas la diffusion des molécules et n'affecte pas l'intégrité de la barrière. Lors de l'utilisation de cellule de diffusion, le débit ne doit pas être trop élevé pour ne pas stopper la diffusion de la substance à travers ce fluide. Il est également important de noter que pour les expériences sur explants de peau viable, ce fluide doit assurer la viabilité tout le long de l'expérience. Dans le cas de l'emploi de cellules de Franz, ce fluide doit être continuellement agité.

2.4.1.1.3. Les explants de peau

L'utilisation d'explants de peau humaine ou animale, est soumise aux considérations éthiques internationales et nationales. Les explants de peau utilisés comprennent le plus souvent le *stratum corneum*, l'épiderme et le derme (*i.e.* épaisseur > 1 mm) ; néanmoins dans certaines études, les essais sont réalisés à partir de peau dermatomée d'épaisseur variant de 200 à 400 µm. Ces membranes ne possèdent plus de derme profond, éliminé à l'aide d'un dermatome. Les phénomènes d'accumulation des espèces hydrophobes dans cette zone sont ainsi éliminés mais la pénétration systémique reste envisagée du fait de la présence des vaisseaux sanguins au niveau du derme papillaire. Lors de cette étape, les follicules pileux sont endommagés, empêchant ainsi la détermination de la pénétration transfolliculaire (Vogt, 2007 ; Wosicka, 2010).

Pour conserver leur métabolisme actif, les peaux excisées doivent être utilisées dans les 24h. Pour des raisons pratiques, les explants de peau peuvent être conservés plusieurs mois (<1 an) à -20°C. Dennerlein *et al.* ont montré qu'aucune différence n'était observée entre une peau congelée et une peau stockée à froid ou non, lors de l'étude la pénétration cutanée de solvants organiques (toluène et éthanol) sur des explants de peau de porc (Dennerlein, 2013). Nielsen *et al.* ont montré également que la congélation n'altère pas la fonction barrière de la membrane épidermique (Nielsen, 2011). Avant utilisation, il est conseillé de montrer l'intégrité de la peau. Pour ce faire, après décongélation, la perte insensible en eau (PIE) peut être mesurée par un tewamètre. La mesure est effectuée à l'aide d'une sonde appliquée à la surface de la peau pendant 30 s. Ce dispositif permet de déterminer la quantité d'eau évaporée lors de ce contact. Cette quantité est exprimée en g.h⁻¹.m⁻². Des valeurs élevées de PIE indiquent donc une altération de la fonction barrière de la peau (>15 g.h⁻¹.m⁻²)

2.4.1.1.4. Formulation appliquée

Pour traduire une exposition humaine, il est généralement appliqué une quantité de produit comprise entre 1 et 5 mg.cm⁻² pour une formulation solide et une quantité supérieure à 10 µL.cm⁻² pour un liquide. Cette quantité peut être modulée en fonction de l'objectif de l'étude et des caractéristiques physico-chimiques de la molécule appliquée. Dans le cas d'application en dose infinie, un grand volume par quantité de surface est appliqué.

2.4.1.1.5. Température et humidité

La diffusion des molécules dans la peau est influencée par la température et le taux d'humidité ; ainsi l'expérience doit être menée à 35°C ± 1°C avec un taux d'humidité compris entre 30 et 70 %.

2.4.1.1.6. Temps d'exposition

Le temps de l'expérience est fonction des études ; néanmoins, il est souvent fixé à 24 h mais il peut varier en fonction des études et des molécules étudiées. Certaines molécules présentent une forte pénétration, ainsi un temps plus court peut être défini.

2.4.1.1.7. Analyses

La quantité de substance mesurée en fin de manipulation doit être proche de 100 %, un écart de 10 % est néanmoins toléré.

2.4.2. Les méthodes « *in vivo* »

En Europe, l'utilisation d'explants de peau *in vitro* est la seule technique admise pour évaluer la pénétration cutanée chez l'homme. Néanmoins, dans certains pays, comme les Etats-Unis, le Canada, ou encore le Mexique, les études *in vitro*, sont également complétées par des données *in vivo* chez la souris.

Les lignes directrices de l'OCDE, décrivent la méthode à appliquer pour déterminer la pénétration d'une substance à travers la peau et jusqu'au passage de cette dernière dans le sang. Ce test garantit une intégrité du système physiologique et métabolique de la peau. Les principaux désavantages sont l'utilisation d'animaux vivants, de matériaux radiomarqués et la détermination de facteurs de transposition entre les résultats obtenus chez la souris et ceux attendus chez l'Homme. La peau de l'animal est généralement plus perméable et entraîne une surestimation de l'absorption percutanée. De plus, les matériaux corrosifs ou caustiques ne peuvent être testés chez l'animal. La substance est appliquée sur la peau de l'animal pendant une période déterminée et sous occlusion ou non en fonction des données désirées. À la fin du temps d'exposition, la peau est lavée à l'aide de papier absorbant qui sera dosée pour déterminer la quantité n'ayant pas pénétré dans la peau. Les animaux seront stockés avant, pendant, et après l'exposition dans des cages individuelles. La substance devra être quantifiée dans les fèces de l'animal mais également dans l'air expiré. Toutes les études doivent être menées sur plusieurs groupes d'animaux. Le premier groupe sera tué à la fin de la période d'exposition tandis que le second sera tué avec un intervalle de temps plus ou moins long variant en fonction des études. A la fin de l'étude, le sang, le site d'application, la carcasse et les matériaux non excrétés seront analysés (Bronaugh, 1990 ; Feldman, 1970).

Pour des raisons de taille, de prix et de temps, la très grande majorité des expérimentations animales se font sur des rongeurs, qui restent l'animal le plus connue d'un point de vue génétique. Cependant l'expérimentation animale reste très controversée et une directive européenne a été approuvée en 2010 afin de mieux l'encadrer. Elle se déroule donc dans un cadre prévu. Les animaux doivent être produits dans des lieux différents de ceux où les expériences sont menées. Lorsqu'ils proviennent d'un autre établissement, une période d'acclimatation est nécessaire avant leur utilisation. Le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale s'appuie sur la règle des 3 R : réduire, raffiner, remplacer. De plus, les expériences susceptibles d'entraîner de la douleur et incompatibles avec l'emploi d'anesthésiques ou d'analgésiques, doivent être limitées au strict minimum et expressément déclarées et justifiées auprès du préfet par l'expérimentateur titulaire d'une autorisation d'expérimenter avant leur mise en œuvre. Il ne peut être procédé à plus d'une intervention douloureuse sur un même animal. En fin d'expérimentation, plusieurs cas peuvent être envisagés, l'animal peut être maintenu en vie, utilisé pour une autre expérimentation, euthanasié ou remis en liberté. En complément de cette directive, de manière autonome, des scientifiques (suisses et allemands principalement) ont rédigé et lancé en novembre 2011 la «Déclaration de Bâle» (Basel Déclaration), rapidement signé par près de 900 chercheurs ou laboratoires dont 500 hors de Suisse et d'Allemagne (Directive 2010/63/UE).

Ainsi, les deux méthodes décrites par l'OCDE envisagent soit l'expérimentation animale sur les souris principalement soit la réalisation de tests *in vitro* à partir d'explants de peau. Ces deux méthodes présentent néanmoins des inconvénients. Les méthodes *in vivo* prévoient un protocole lourd à mettre en place et l'extrapolation des résultats obtenus chez l'animal reste difficilement applicable à l'Homme. Ainsi, les méthodes *in vitro* sont les techniques les plus utilisées pour l'investigation de la pénétration cutanée d'une substance. Néanmoins, l'utilisation de modèles *in vitro* peut, dans certaines conditions, influencer le taux de pénétration des composés à travers la peau. En effet, lors de l'excision et de l'enlèvement de l'hypoderme, les fibres élastiques entourant l'unité pilo-sébacée peuvent se contracter et bloquer leur ouverture, réduisant ainsi le réservoir folliculaire et la pénétration transfolliculaire (Lademann, 2001).

Ainsi afin de substituer l'utilisation de ces explants de peau, de nouvelles méthodes sont également développées. Elles sont basées sur l'utilisation de modèle de peau reconstruite, certains de ces modèles sont même industrialisés (Roguet, 2002 ; Boyce, 1988 ; Shahabeddin, 1990), mais leur utilisation n'est pas encore décrite dans les réglementations OCDE.

3. La pénétration des particules dans la peau

Selon de nombreuses études, la pénétration des particules dans la peau dépend de leur taille, de leur charge, de leur surface spécifique et du type de formulation dans lesquelles elles sont dispersées. L'utilisation de promoteur d'absorption dans la formule est un autre élément à considérer.

3.1. Pénétration des particules en fonction de leur taille

Les premières études portant sur la pénétration des particules dégradables dans la peau ont été menées sur les microparticules par Rolland *et al.* et Schaefer *et al.* dans les années 90. Ces deux études ont mis en évidence la forte implication de la voie transfolliculaire dans le mécanisme de pénétration cutanée des particules polymères. Rolland *et al.* se sont intéressés à la pénétration de microsphères de poly-(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) de différentes tailles comprises entre 1 et 20 μm , contenant de l'adapalène et dispersées dans un gel aqueux. Le modèle *in vivo* était la peau d'abdomen de rat et une étude clinique chez l'Homme au niveau des avant-bras. La pénétration des microparticules a été évaluée par dosage de l'adapalène dans les différentes strates cutanées ainsi que l'analyse de biopsie cutanée et l'analyse des follicules pileux. Ils ont ainsi mis en évidence que des particules de 5 μm ne pénètrent pas le *stratum corneum* mais sont retrouvées dans les folliculeux pilo-sébacés. Les particules de 20 μm ne pénètrent pas du tout dans la peau et les particules de 1 μm sont réparties de manière homogène dans les couches superficielles de la peau ainsi que dans les follicules pileux, mais ne sont pas retrouvées dans l'épiderme viable (Rolland, 1993). Schaefer *et al.* se sont également intéressés à la pénétration des particules dans la peau et ont aussi conclu que les particules de taille supérieure à 10 μm ne pénètrent pas dans la peau, les particules de taille comprise entre 9 et 10 μm s'accumulent autour de l'entrée des follicules pileux ouverts, et les particules de 7 μm pénètrent dans le follicules pileux mais ne sont pas retrouvées dans l'épiderme viable. La taille de 3 μm est donnée comme une limite pour que les particules pénètrent dans la couche cornée (Schaefer, 1990).

L'application topique de médicaments a fortement été étudiée, présentant de nombreux avantages : l'action est localisée, facilement appliquée, et les traitements sont très bien acceptés par les patients. Néanmoins, la pénétration des molécules à travers la peau reste difficile et peu de molécules peuvent franchir cette barrière. Ainsi, de nombreuses études portant sur le développement de NPs ont été réalisées. Ces vecteurs présentent les caractéristiques nécessaires pour franchir la barrière cutanée. Les premières études ont ainsi permis de mettre en évidence la pénétration cutanée *via* la voie transfolliculaire. Les NPs pourraient alors s'accumuler dans ce conduit et libérer leur contenu.

Depuis, de nombreuses expériences ont été menées s'intéressant à la pénétration des microparticules et des nanoparticules dans la peau afin de définir les propriétés optimales pour promouvoir la pénétration. Dans ce chapitre, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement aux NP polymères, particules développées au cours de ce projet. Les études majoritaires ont été synthétisées dans le Tableau 10.

Il est cependant difficile de comparer toutes ses études car elles présentent des protocoles différents. De manière générale, plus les NPs sont petites, plus elles pénètrent profondément dans la peau en empruntant la voie transfolliculaire. Au cours de leur étude *in vitro* sur de la peau humaine excisée, Vogt *et al.* ont mis en évidence que les NPs de 40 nm pénètrent profondément le conduit folliculaire, comparées aux particules de 750 nm et de 1500 nm qui s'accumulent dans les parties supérieures de l'*infundibulum* (Vogt, 2006). Alvarez-Roman *et al.* ont également déterminé *in vitro* sur peau de porc que les particules de polystyrène de 20 nm de diamètre sont retrouvées en plus grande quantité dans les follicules pileux que les particules de 200 nm (Alvarez-Román, 2004). Néanmoins, Patzelt *et al.* ont montré que la profondeur de pénétration de nanoparticules de PLGA de tailles comprises entre 122 et 860 nm appliquées sur la peau d'oreille de porc, était optimale pour une taille de 643 nm (Figure 37) (Patzelt, 2011a). Au cours de cette expérience, les NPs ont été appliquées 30 min après un massage de 3 min, cette étape ayant pour but d'optimiser la pénétration cutanée. Ces données indiquent que la taille optimale des NPs pour la pénétration folliculaire devrait être comprise entre 400 nm et 700 nm, puisqu'il est montré que les particules les plus petites et les plus larges pénètrent moins efficacement dans les follicules pileux. Ce résultat a été expliqué par l'hypothèse suivante : Lademann *et al.* ont montré que la structure du poil de porc montre une épaisseur de cellules de kératine proche de 320 nm permettant le stockage des particules de tailles similaires (structure en zigzag). Le mouvement des poils au sein du follicule pileux pourrait ensuite agir comme une pompe poussant les particules à l'intérieur du conduit folliculaire. *In vitro*, ce mouvement peut être simulé par massage (Lademann, 2009). Au cours de l'étude de Patzelt *et al.*, le *stratum corneum* a été conservé intact (aucun traitement au CSSS (*cyanoacrylate skin surface stripping*)) contrairement à l'expérience menée par Vogt *et al.* (Vogt, 2006). La différence de protocole d'application des particules sur la peau peut donc conduire à l'obtention de résultats différents. Néanmoins, toutes les études montrent que les nanoparticules pénètrent plus au moins profondément dans les follicules pileux. Partant de ce constat, Vogt *et al.* ont proposé une stratégie de vaccination par application topique sur la peau ayant subi une CSSS pour ouvrir l'ensemble des follicules pileux et optimiser la pénétration des particules. Les particules de 40 nm à 225 nm seraient captées par les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques dermiques, puis transportées dans les vaisseaux

lymphatiques pour être présentées aux cellules présentatrices d'antigènes (Vogt, 2006 ; Mahe, 2009).

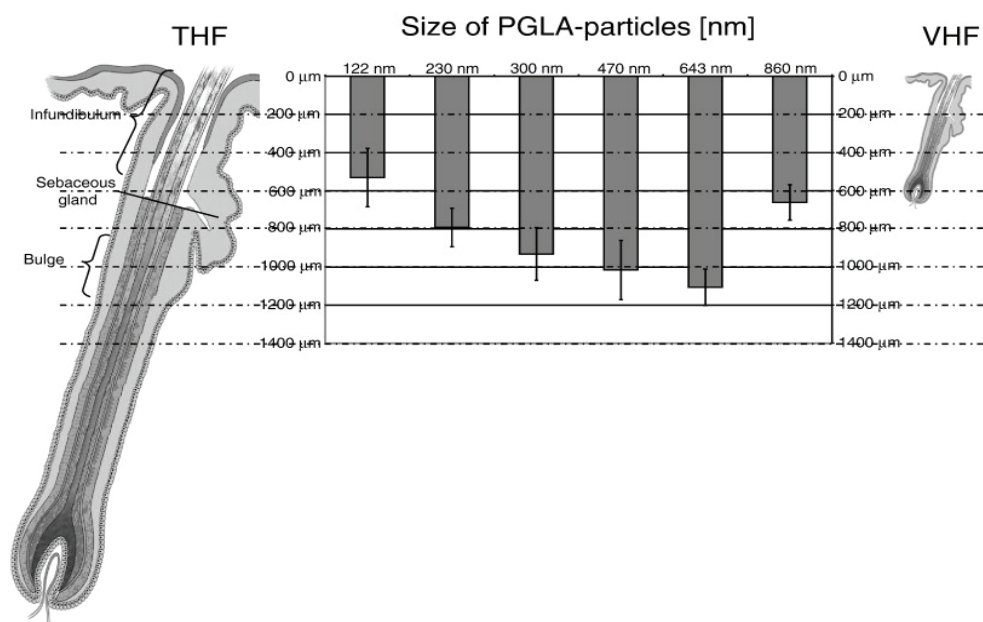


Figure 37: Profondeur de pénétration des NPs de PLGA de différentes tailles (122, 230, 300, 470, 643, 860 nm) comparée à la structure des deux types de poils retrouvés chez l'homme. La profondeur de pénétration est déterminée par microscopie à balayage laser (Patzelt, 2011a).

Tableau 10 : Pénétration cutanée de particules organiques en fonction de la taille

Taille des particules	Systèmes particuliers	Modèle expérimental	Profil de pénétration	Références
20 µm	Particules de PLGA chargées d'adapalène dispersées dans un gel aqueux à 0.1%.	Peau ventrale de rat <i>hairless</i> et peau humaine (<i>in vitro</i>) et peau de souris et d'avant-bras (<i>in vivo</i>).	Pas de pénétration dans la peau, les particules restent en surface du <i>stratum corneum</i>	(Rolland, 1993)
	Microparticules de polystyrène chargées de fluorochromes commercialisées par Polyscience® en suspension à 0.5 % dans une solution éthanoloïque (80 % d'éthanol).	Peau humaine (<i>in vitro</i>) et (<i>in vivo</i>) issue du cuir chevelu, des zones génitales, et des aisselles. Elimination de la couche cornée par CSSS.	La pénétration des particules est indépendante du type de follicules (VHF ou THF). Aucune corrélation entre la phase de pousse du poil et la pénétration des particules. Les particules s'agglomèrent dans les orifices du follicule pileux et peuvent pénétrer jusqu'à 800 µm.	(Toll, 2004)
5 µm	Microsphères de nylon poreuses chargées avec 4 % de Rhodamine 6-G dispersées dans deux huiles siliconées (volatiles ou non)	Peau de rat <i>hairless</i> (<i>in vivo</i>) après rasage et épilation à la cire. Massage d'une minute après application.	Aucune différence de pénétration, quel que soit le véhicule huileux. L'éthanol améliore la pénétration cutanée dans les follicules pileux. Le marqueur fluorescent est uniquement retrouvé dans les follicules pileux (pas dans la couche cornée)	(Sumian, 1999)
	Microsphères de nylon poreuses chargées avec 4 % de Rhodamine 6-G dispersées une huile siliconée	Peau de rat <i>hairless</i> (<i>in vivo</i>) après rasage et épilation à la cire. Lavage à l'éthanol avant application. Analyse à 0, 2 ou 26 h après application	Pénétration uniquement dans les follicules pileux. La profondeur de pénétration au sein des follicules pileux est fonction du temps d'application : profondeur de 175 µm après 26 h.	(Mordon, 2003)
	Particules de PLGA chargées d'adapalène dispersées dans un gel aqueux à 0.1 %.	Peau ventrale de rat <i>hairless</i> et peau humaine (<i>in vitro</i>) et peau de souris et d'avant-bras (<i>in vivo</i>).	Particules retrouvées uniquement dans les follicules pileux.	(Rolland, 1993)

4,6 µm	Particules de PLGA chargées avec la Rhodamine (EE %=60 %)	Peau d'oreille de porc (<i>in vitro</i>), après 6, 12 et 24 h après lavage à l'eau.	Particules retrouvées de façon décroissante jusqu'à l'épiderme mais aucune pénétration observée dans les couches plus profondes quel que soit le temps d'application (observation jusqu'à 500 µm).	(De Jalón, 2001)
2-4 µm	Particules de dextran greffées avec l'isothiocyanate de fluorescéine en suspension dans l'eau à 25 %.	Peau humaine dos ou cuisse (<i>in vitro</i>) soumise à une répétition de flexion pendant 15, 30 et 60 min. La peau est fixée sur un dispositif permettant d'appliquer une flexion à 45°. Lavage au PBS.	Aucune pénétration retrouvée dans la peau quelle que soit la durée d'exposition.	(Tinkle, 2003)
3 µm	Microparticules de polystyrène chargées de fluorochromes commercialisées par Polyscience® en suspension à 0.5 % dans une solution éthanoloïque (80 % éthanol)	Peau humaine (<i>in vitro</i>) et (<i>in vivo</i>) issue du cuir chevelu, des zones génitales et des aisselles.	Les particules s'agglomèrent dans les orifices des follicules pileux.	(Toll, 2004)
0,75-1,5 µm	Microparticules de polystyrène chargées de fluorochromes commercialisées par Polyscience® en suspension à 0.5 % dans une solution éthanoloïque (80 %).	Peau humaine (<i>in vitro</i>) et (<i>in vivo</i>) issue du cuir chevelu, des zones génitales et des aisselles.	Le prétraitement par CSSS permet d'optimiser la pénétration des particules de taille de 1,5 µm. Les particules de taille 0,75 et 1,5 µm sont retrouvées de manière homogène dans la couche cornée mais aucune accumulation dans les follicules pileux n'est reportée.	(Toll, 2004)
0,75-1,5 µm	Microparticules de polystyrène chargées de fluorochromes commercialisées par Polyscience® en suspension à 0.1 % dans du PBS (Yellow-green fluorescence).	Peau humaine de sein ou derrière de l'oreille (<i>in vitro</i>). Réalisation de 2 CSSS avant application pendant 15 à 16 h.	Pas de pénétration des particules dans les cellules de Langerhans (LC) après application sur la peau. Particules retrouvées dans le tissu épithélial des follicules pileux de type VHF, agrégation des particules à l'entrée des follicules pileux, pas de particule dans l'épiderme et derme. Après co-culture LC-NPs, les NPs sont internalisées au sein des cellules dendritiques.	(Vogt, 2006)

1 µm	Particules de PLGA chargées d'adapalène dispersées dans un gel aqueux à 0.1 %.	Peau ventrale de rat <i>hairless</i> et peau humaine (<i>in vitro</i>) et peau de souris et d'avant-bras (<i>in vivo</i>).	Pénétration dans les appendices cutanés et dans le <i>stratum corneum</i> , mais pas dans l'épiderme viable.	(Rolland, 1993)
0.5-1 µm	Particules de dextran greffées avec l'isothiocyanate de fluorescéine suspension dans l'eau à 25 %.	Peau humaine dos ou cuisse (<i>in vitro</i>) soumise à une répétition de flexion pendant 15, 30 et 60 min. La peau est fixée sur un dispositif permettant d'appliquer une flexion à 45°. Lavage au PBS.	Pénétration jusqu'au derme uniquement si la peau est soumise à des flexions répétées	(Tinkle, 2003)
500 nm	Particules d'albumine de sérum bovin co-précipitées avec du carbonate de calcium en suspension dans 1 % de PBS.	Peau d'oreille de porc (<i>in vitro</i>) – étude de la pénétration des particules sans dégradation et après application simultanée avec la protéase de type I responsable de sa dégradation.	-Pénétration du fluorochrome seul à 450 µm dans le follicule pileux (après application de la solution contenant les particules dégradées et le fluorochrome). -Pénétration des particules à 800 µm de profondeur dans le follicule après application des particules seules ou en présence de l'enzyme de dégradation.	(Mak, 2011)
364 nm	Nanoparticules d'éthyle cellulose chargées de curcumine (0.5 %) en suspension aqueuse ou en émulsion de type huile dans eau, ou eau dans huile.	Peau d'oreille de porc (<i>in vitro</i>).	Pénétration des nanoparticules au sein des follicules pileux de 100 à 400 µm de profondeur en fonction de la formulation. Profondeur : 100 µm en suspension aqueuse (présence de nombreux agrégats, pas de pénétration dans la couche cornée), 270 µm émulsion de type huile dans eau (présence moyenne d'agrégats, pénétration faible dans la couche cornée), 350 µm émulsion de type eau dans huile (peu d'agrégats, pénétration faible dans la couche cornée).	(Suwannateep, 2013)

320 nm	<p>Particules de type Resomer® RG (PLGA) liées de manière covalente avec le 5-fluoresceinamine à 1 % en suspension aqueuse.</p>	<p>Peau d'oreille de porc (<i>in vitro</i>) avec ou sans massage. Peau humaine : application sur le cuir chevelu.</p>	<p>Comparaison de la pénétration du 5-fluoresceinamine lié ou non à des NPs. Les mêmes résultats sont obtenus pour ces deux formulations si aucun massage n'est réalisé sur la peau après application. Pénétration plus profonde des NPs après massage comparée à celle de la forme libre. Le marqueur fluorescent est retrouvé dans la peau des volontaires 10 jours après l'application lorsque ce dernier est lié à une particule. En revanche il n'est visible que 4 jours sans liaison à une particule. Cette différence pourrait être due aux mouvements du poil qui agiraient comme une pompe et entraineraient les particules en profondeur au sein du follicule pileux</p>	(Lademann, 2007)
265 nm	<p>Nanoparticules d'éthyle cellulose chargées de curcumine (0.5 %) en suspension aqueuse ou en émulsion de type huile dans eau, ou eau dans huile.</p>	<p>Peau d'oreille de porc (<i>in vitro</i>). Massage pendant 1 min.</p>	<p>Pénétration des nanoparticules au sein des follicules pileux de 100 à 400 µm de profondeur en fonction de la formulation. Profondeur : 200 µm en suspension aqueuse (présence d'agrégats pas de fluorescence dans la couche cornée), 350 µm en émulsion de type huile dans eau (présence moyenne d'agrégats, pénétration faible dans la couche cornée), 780 µm en émulsion de type eau dans huile (peu d'agrégats, forte pénétration dans la couche cornée).</p>	(Suwannateep, 2013)

210 nm	Nanoparticules de PLA (poly-(lactic acid)) chargées de 0.2 % de 4-(4-diethylaminostyryl)-N-methylpyridinium iodide (4-Di-2-Asp) en suspension aqueuse à 0.5 %.	Peau humaine (abdomen, derrière de l'oreille, sein). Application pendant 2, 4, 8 et 16 h après CSSS.	Accumulation des particules dans l'ensemble du follicule pileux. Pas de déstabilisation des particules après 16 h d'application (forme identique) dans les couches superficielles. Pas de pénétration des particules dans les cellules de l'épiderme déterminée par cytométrie.	(Rancan, 2012)
200 nm	Nanoparticules de polystyrène (FluoSpheres®) carboxylate recouvertes d'un polymère hydrophile contenant des groupements acides carboxyliques liés à la fluorescéine 5-isothiocyanate.	Peau d'oreille de porc (<i>in vitro</i>). Application durant 0,5, 1 et 2 h.	Les particules s'accumulent préférentiellement autour des orifices des follicules pileux. L'augmentation de la distribution est augmentée proportionnellement au temps d'application. Les particules sont également retrouvées à l'intérieur des sillons cutanés.	(Alvarez-Román, 2004)
165 nm	Nanoparticules de PLA chargées à 0.2 % de bromomethyl-4,4-difluoro-3,5-bis-(2-thienyl)-4-bora-3a, 4a-diazasindacene (4-Di-2-Asp) en suspension aqueuse à 0.5 %.	Peau humaine (abdomen, derrière de l'oreille, sein). Application pendant 2, 4, 8 et 16 h après CSSS.	Déstabilisation des particules entre 4 et 8 h d'application. Pénétration de particules dans l'ensemble des follicules pileux. Pas de pénétration des particules dans les cellules de la couche cornée.	(Rancan, 2012)
188 nm	Nanoparticules de poly-(n-butyrcyanoacrylate) chargées de Rhodamine en suspension à 10 % (w/w) dans du tampon phosphate.	Peau de l'abdomen de rats Wistar, application 2 h (<i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>).	<i>In vitro</i> , présence de particules jusqu'au derme. <i>In vivo</i> , présence de particules jusqu'à la circulation sanguine.	(Miyazaki, 2003)
40-130 nm	Nanoparticules de Poly-(ε-caprolactone)-PEGylées encapsulant du rubrene (marqueur fluorescent) en suspension aqueuse à 10 % et 2 % d'éthanol.	Peau d'abdomen de cochon d'Inde (<i>in vivo</i>). Application pendant 12 h.	Accumulation dans les ouvertures folliculaires et dans la couche cornée.	(Shim, 2004)

40 nm	Nanoparticules de polystyrène chargées de fluorochromes (Yellow-green fluorescence) commercialisées par Polyscience® en suspension à 0.1 % dans du PBS.	Peau humaine de sein ou de derrière de l'oreille (<i>in vitro</i>). Réalisation de 2 CSSS avant application de 15 h à 16 h.	Pénétration des particules dans les cellules de Langerhans (LC) après application sur la peau. Particules retrouvées dans le tissu épithélial des follicules pileux de type VHF, présence de particules dans l'épiderme viable. Après co-culture LC – NPs, les NPs sont internalisées au sein des cellules dendritiques.	(Vogt, 2006)
20 nm	Nanoparticules de polystyrène (FluoSpheres®) carboxylate-recouvertes d'un polymère hydrophile contenant des groupements acides carboxyliques liés à de la fluorescéine 5-isothiocyanate.	Peau d'oreille de porc (<i>in vitro</i>). Application durant 0,5, 1 et 2h.	Les particules pénètrent en profondeur au sein du follicule pileux, plus forte accumulation de particules de taille de 20 nm comparées à des particules de taille de 200 nm.	(Alvarez-Román, 2004)

3.2. Pénétration des particules en fonction de leur charge électrique de surface

Par ailleurs, la charge superficielle des particules permet de prévenir leur agrégation potentielle et permet parfois de garantir la stabilité des particules vis-à-vis des autres composants de la formulation.

Yoo *et al.* ont étudié la pénétration de liposomes multi-lamellaires contenant du sel de magnésium d'acide ascorbique-2 phosphaté (pour stimuler la pousse des cheveux) de charges différentes (positive, neutre, et anionique). Les liposomes sont préparés avec un mélange de la phosphatidilcholine et de cholestérol. Pour induire une charge de surface positive et négative, sont utilisés respectivement le dioleoyl-triméthylammonium-propane et le dimyristoyl glycerophosphate. Les trois formulations possèdent des tailles voisines inférieures à 1 μm . La pénétration cutanée est étudiée *in vitro* sur des souris *hairless*. Les liposomes cationiques se sont présentés comme les meilleurs vecteurs pour optimiser la pénétration à travers la peau (Yoo, 2008).

Jung *et al.* se sont intéressés à la pénétration à travers la peau d'oreille de porc de liposomes de charges positives, négatives et neutres encapsulant un marqueur fluorescent. La pénétration cutanée a été déterminée par microscopie confocale laser à balayage. Elle est principalement réalisée à travers les follicules pileux, peu de marqueurs ont été retrouvés dans les autres compartiments cutanés. Les particules anioniques sont retrouvées jusqu'à 50 % ($\approx 300 \mu\text{m}$) de la profondeur des follicules pileux tandis que les particules neutres et anioniques sont retrouvées à 70 % ($\approx 420 \mu\text{m}$) de la profondeur. Il est suggéré que les charges positives en interagissant avec les charges négatives des membranes cellulaires pourraient favoriser la pénétration (Jung, 2009).

Dragicevic-Curic *et al.* ont analysé l'influence de la charge des flexosomes (liposomes avec une membrane flexible) sur la pénétration cutanée à partir d'explants de peau humaine d'abdomen (*in vitro*). Les liposomes sont composés d'un mélange de phosphatidilcholine et de polysorbate 20. Du dicetyl phosphate est ajouté pour obtenir des particules négatives et de la stearylamine pour obtenir les positives. Les différentes particules chargées avec du temoporfine (photosensibilisant) présentant une taille proche de 100 nm sont dispersées dans du PBS (à 10%). Les liposomes cationiques se sont présentés comme la forme permettant la plus grande pénétration de temoporfine dans la couche cornée mais également dans les couches plus profondes (Dragicevic-Curic, 2010).

Venuganti *et al.* ont exploré la pénétration de dendrimères de poly-(amidoamine) (PAMAM) encapsulant de l'isothiocyanate de fluorescéine de taille proche de 15 nm sur de la peau d'oreille de porc en fonction de la charge. Les dendrimères cationiques ont présenté une profondeur de pénétration plus élevée que les deux autres types de particules, la pénétration des particules étant optimisée par ionophorèse (Venuganti, 2011).

Chen *et al.* ont étudié l'influence de la charge sur la pénétration de nanoparticules lipidiques encapsulant du triptérine (anti-cancéreux) sur de la peau de souris *in vivo* et *in vitro*. Les particules présentent une taille proche de 100 nm avec des taux d'encapsulation compris entre 64 et 72 %. La pénétration de la triptérine s'est avérée dépendante de la charge des particules avec par ordre décroissant NPs cationiques > NPs anioniques > NPs neutres (Chen, 2012).

Ces études menées sur différents types de NPs (dendrimères, liposomes, nanoparticules lipidiques) montrent que les particules de charge positive présentent une meilleure pénétration cutanée. En effet, ces dernières peuvent interagir plus facilement avec les membranes cellulaires chargées négativement.

3.3. Pénétration des particules en fonction du coefficient de partage

La pénétration des particules peut être influencée par leur surface. En effet, en fonction du type de surfactants utilisés, de la composition de la NP, la particule peut présenter un caractère hydrophile-lipophile différent pouvant impacter la distribution des NPs à l'intérieur de la peau. Le coefficient de partage eau / huile et la dispersion des NPs pourraient également avoir une influence sur leur absorption dans la peau. Il a été montré que les molécules possédant un coefficient de partage octanol / eau compris entre 1 et 3 présentaient les conditions optimales pour pénétrer dans la peau (Schneider, 2009), mais aucune étude a validé cet intervalle pour les NPs.

Yang *et al.* ont étudié la pénétration de dendrimères de PAMAM encapsulant de la Rhodamine B isothiocyanate dans de la peau de flanc de porc en microscopie confocale. Plusieurs dendrimères de taille identique possédant des propriétés de surface différentes et des log P compris entre -1.25 et 1.25 ont été appliqués. Les auteurs ont montré que les pourcentages de particules retrouvées dans la peau pour un log P de -1.25 et pour un log P de 1.25 étaient respectivement de 10 % et de 60 %. Cette étude montre l'influence de ce paramètre sur la déposition dans la peau, mais aucune donnée sur les profondeurs de pénétration a été recueillie (Yang, 2012).

3.4. Pénétration des particules en fonction du type de NPs

Quel que soit le type de NPs (liposomes, NPs lipidiques, NPs polymères), la pénétration de la molécule encapsulée dans la peau est augmentée par rapport à l'utilisation de formes plus conventionnelles comme les émulsions, les crèmes, les lotions... (Baroli, 2010).

Les NPs lipidiques présentent un caractère lipophile très important et ne pénètrent pas dans la peau. Elles possèdent des propriétés d'occlusion, optimisant la pénétration des actifs dans la peau (Jensen, 2011). Après libération de leur actif, les nanoparticules solides lipidiques (SLNs) formeraient un film à la surface de la peau en fusionnant avec les lipides de la couche cornée et pourraient augmenter l'hydratation cutanée et renforcer la fonction barrière de la peau dans le cas de certaines pathologies telle que la dermatite atopique, tout en participant à la vectorisation de l'actif encapsulé (Jensen, 2011 ; Weidinger, 2006). Néanmoins les SLNs formées par un mélange de lécithine de soja, de poloxamer et de polysorbate 80 de taille proche de 100 nm pourraient emprunter également les follicules pileux ou s'accumuleraient dans les rides et ridules de la peau d'abdomen de cochon lors de leur application ; en effet une accumulation de marqueur fluorescent a été retrouvée dans ces zones (Chen, 2006).

Il est difficile de déterminer si les NPs polymères pénètrent dans la peau, ou si elles sont déstabilisées dès leur application sur la peau, ou dégradées dans les différentes assises cutanées. Dans la majorité des études présentes dans la littérature, les NPs encapsulent un marqueur fluorescent, et la pénétration de cette molécule est visualisée dans la peau. Peu d'études s'intéressent à la pénétration des particules intégralement. Samah *et al.* ont rapporté que les NPs de poly (N-isopropylacrylamide) et poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylique acid) de taille comprise entre 200 et 250 nm dispersées dans un gel, pénétraient à travers l'épiderme de la peau d'oreille de porc. Les NPs ont été détectées par microscopie électronique à transmission dans le liquide récepteur des cellules de diffusion. Néanmoins, au cours de ces travaux, l'épiderme a été isolé par chauffage à 60°C pouvant induire des dommages aux lipides composant la couche cornée et déstabiliser leur structure (Samah, 2010).

Küchler *et al.* ont comparé la pénétration de deux types de nanoparticules : des CMS (*dendritic core multi-shell nanotransporters* ou dendrimères dits hyperbranchés, ramifiés avec des chaînes alkyles hydrophobes avec un cœur hydrophile) composés de polymères biodégradables et des SLNs de glyceryl behenate. Ces deux structures contenaient un marqueur fluorescent, le Nile-Red. Les CMS présentaient une taille comprise entre 20 et 30 nm et les SLNs comprises entre 150 et 170 nm. La pénétration cutanée a été évaluée *in vitro*

sur la peau de porc. Les CMS ont ainsi permis d'augmenter significativement la présence de Nile-Red dans le *stratum corneum* (3.4 fois) comparées aux SLNs. Cette différence pourrait être due à la petite taille des CMS ou à la différence de structure. L'analyse de la surface cutanée par microscopie électronique à balayage après dépôt de SLNs a montré qu'après 4 h d'application plus aucune particule n'était retrouvée à la surface de la peau, traduisant une déstabilisation des SLNs au contact de la couche cornée expliquant une différence de pénétration de ces deux types de NPs. Néanmoins, les auteurs ne reportent pas de données sur la présence de CMS non dégradées à la surface de la peau (Küchler, 2009).

3.5. Pénétration des particules en fonction de la formulation

Il a également été montré que la formulation dans laquelle était dispersée les NPs influencée le profil de pénétration. En effet, à titre d'exemple, plus le nombre de particules en suspension était grand, plus la pénétration était favorisée. De plus, la composition de la formulation doit également être prise en compte pour évaluer la pénétration cutanée. La présence de solvants, de surfactants, de promoteurs de pénétration et d'autres agents peuvent altérer ou endommager par différents procédés la couche cornée, favorisant ainsi l'absorption cutanée de tous les ingrédients. Le plus souvent, les NPs sont appliquées sous forme de dispersions aqueuses, de dispersions dans des co-solvants (eau / solvants organiques), dans des crèmes, ou encore des gels.... La formulation appliquée sur la peau, peut alors induire une déstabilisation de la structure de la couche cornée et influencer la pénétration, ou au contraire peut former une couche protectrice limitant ainsi la pénétration. Grams *et al.* ont montré qu'un véhicule présentant une forte lipophilie augmentait la pénétration des particules dans les follicules pileux (Grams, 2002). Illel a montré que l'utilisation de véhicules polaires pourrait induire une augmentation de la concentration de composés dans les follicules pileux. L'éthanol provoquerait par exemple un gonflement de la couche cornée et affecterait sa structure en solubilisant les lipides cutanés et en agrandissant ainsi les espaces intercellulaire (Illel, 1997). Tata *et al.* ont montré que la pénétration du minoxidil dans les follicules pileux était augmentée par l'utilisation d'éthanol et de propylène glycol (Tata, 1995). Patzelt *et al.* se sont intéressés à l'influence de la formulation sur la pénétration au sein des follicules pileux *in vitro* sur de la peau d'oreille de porc. Quatre formulations ont été testées à savoir une suspension dans un mélange éthanol / eau, une suspension dans l'eau, un gel éthanol / eau et un gel à base d'eau, contenant des particules de silices recouvertes de polymères (poly-(allylamine hydrochloride) / polyanions poly-(styrène sulfonate / poly-(methacrylic acid sodium salt) substitués par un peptide fluorescent (rhodamine modifiée) de taille proche de 1 µm. La pénétration des particules s'est avérée similaire lors de l'application des deux types de suspensions et des deux types de gels. En revanche, une augmentation significative de la pénétration cutanée a été

mesurée en comparant les formes gels aux suspensions (Patzelt, 2011b). Les formes gels pourraient réduire les phénomènes d'agrégation comparés aux dispersions diminuant les mouvements des particules au sein de la formule (Batheja, 2011). D'autres auteurs ont rapporté que les gels hydrophiles pourraient être considérés comme des promoteurs de la pénétration cutanée dans le cas de nanocapsules (Alvarez-Román, 2001), de liposomes (Glavas-Dodov, 2002), et de nanoparticules lipidiques solides (Pople, 2006).

4. Conclusion

La peau possède une structure complexe permettant de nous défendre contre les agressions de notre environnement extérieur. Néanmoins, depuis une vingtaine d'année, de nouvelles stratégies de traitement par application topique ont été envisagées avec le développement des nanoparticules. Il a été montré que ces vecteurs empruntent principalement la voie transfolliculaire et permettraient la diffusion des molécules encapsulées jusqu'à la circulation sanguine. Afin d'étudier la pénétration cutanée, de nombreux modèles ont été optimisés *in vitro* mais également *in vivo*. Les méthodes *in vitro* regroupent principalement l'utilisation d'explants de peau de porc ou de peau humaine placés dans une cellule de diffusion. De plus, certains modèles de peau ont été développés pour remplacer l'expérimentation animale mais peu de données ont été collectées à l'heure actuelle. Les méthodes *in vivo* sont essentiellement réalisées sur des rongeurs faisant souvent appel à l'utilisation de la microscopie. Néanmoins, la limite de résolution des appareils disponibles ne permet pour l'instant de visualiser avec précision des nanoparticules dans la peau. Les nanoparticules se présentent comme de véritables promoteurs de la pénétration cutanée comparées à des formes plus conventionnelles comme les émulsions, les crèmes, les solutions... Néanmoins, le protocole d'administration (massage, décollement de la couche cornée...), la taille, le type de particules influencent la pénétration cutanée. Les NPs cationiques, de taille inférieure à 200 nm, polymères dispersés dans un gel pourraient présenter toutes les conditions pour optimiser la pénétration de molécules. En outre, nous n'avons pas abordé les mécanismes de pénétration dans une peau lésée. En effet, comme nous allons le voir dans le chapitre suivant certaines maladies de peau peuvent totalement modifier les mécanismes cutanés.

Nanoparticules et eczéma allergique de contact, outils d'innovation

L'Organisation Mondiale de la Santé considère l'Allergie comme la quatrième maladie dans le monde après le cancer, les pathologies cardiovasculaires et le Sida. La prévalence des maladies allergiques (dermatite atopique, asthme, rhinite, conjonctivite et allergie alimentaire) a considérablement augmenté dans les pays industrialisés au cours de ces dernières années. En effet, les études épidémiologiques estiment la prévalence cumulée des maladies allergiques à 25-30 % (Demoly, 2001). Les maladies allergiques représentent donc un véritable problème de Santé publique.

L'eczéma allergique de contact (EAC) représente la première cause de dermatoses professionnelles. Chez certains individus, cette maladie inflammatoire survient suite aux contacts répétés avec des molécules chimiques non protéiques, douées de propriétés sensibilisantes, appelées haptènes (Coenraads, 2007). Plus de 4000 xénobiotiques ont été recensés à ce jour pour leur caractère sensibilisant, et sont retrouvés dans différentes catégories de produits comme les conservateurs, les parfums, les colorants ou encore sont issus de certains produits comme les métaux. L'ensemble de ces produits présente une faible taille (< 500 Da) et peuvent ainsi facilement pénétrer dans la peau (Dean, 2001 ; Brasch, 2007 ; Martin, 2006). D'un point de vue de la physiopathologie, l'EAC correspond à une réponse immunitaire adaptative de type hypersensibilité retardée, résultant de l'activation et du recrutement dans la peau de lymphocytes T (LTs) spécifiques d'haptènes, responsables du développement de la lésion d'eczéma (Nosbaum, 2009). Cette pathologie peut avoir une évolution chronique et sa prise en charge nécessite un diagnostic fiable, qui peut s'avérer parfois complexe, pour identifier avec précision la / les molécule(s) incriminée(s) responsable(s) de la maladie. Une fois informé sur la molécule coupable, le patient allergique aura pour principal recours pour prévenir la récurrence de son allergie d'éviter tout nouveau contact avec cette molécule, ce qui n'est pas sans poser parfois de véritables problèmes en termes de perte d'emploi ou de réorientation professionnelle.

Les parfums sont impliqués dans de nombreux cas de développement d'EAC aux cosmétiques. Ainsi, ils présentent une forte prévalence dans la population mondiale, variant de 0.5 à 5.8 % en fonction des études. Cette prévalence aurait augmenté en Europe de 4,1 à 9,9 %, en dix ans (Pons-Guiraud, 2007 ; Uter, 2005). Ainsi, les parfums, au même titre que d'autres allergènes tels que certains conservateurs, ou le nickel dans le passé, font aujourd'hui l'objet d'une attention toute particulière de la part des organismes de surveillance sanitaire et des législateurs, qui souhaitent réguler leur utilisation afin de limiter l'accroissement des phénomènes de sensibilisation / d'allergie.

1. Allergie aux parfums

1.1. Epidémiologie et caractérisation des molécules sensibilisantes

Les parfums sont des substances naturelles ou synthétiques, fréquemment incriminées dans le développement de l'EAC. Actuellement, plus de 2500 molécules odorantes ont été recensées. Un parfum, à proprement dit, peut contenir de 10 à 300 molécules en fonction de l'odeur recherchée. Ils sont utilisés dans les biens de consommation (les cosmétiques, les détergents, les assouplissants et autres produits à usage domestique), dans la parfumerie fine mais également dans certains produits alimentaires (épices, crèmes glacées, chewing-gums...). En 1999, le SCCNFP (*Scientific Committee on Cosmetic and Non-Food Products*) a reporté un lien entre ces molécules et le développement de réactions allergiques (SCCNFP/0017/98, 1999) (Frosch, 2005a).

Nardelli *et al.* ont mené une étude entre janvier 1990 et décembre 2005 sur 10 128 patients, consultant le service dermatologique de Leuven dans le but de diagnostiquer la cause de leur EAC. 1463 des personnes (soit 14.5 %) dont 26 % d'hommes et 74 % de femmes, ont réagi positivement à au moins un allergène odorant de la batterie standard européenne (BSE) : 9 % au FMI, 6 % au *Myroxylon pereirae* (aussi appelé baume du Pérou), 4.8 % à la colophane, 2.1 % à l'hydroxyisohéxyl 3-cyclohexene carboxaldéhyde avec une localisation au niveau des mains et du visage (Nardelli, 2008). Cette étude a permis de lister un groupe de 26 molécules au potentiel allergisant.

Afin de diagnostiquer les molécules odorantes impliquées dans le développement de l'EAC, la batterie standard européenne (BSE) de l'International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG), comporte actuellement cinq marqueurs de l'allergie aux parfums à savoir le Fragrance Mix I (FMI), le Fragrance Mix II (FMII), le lylal, le *Myroxylon pereirae* et la colophane (Api, 2006 ; Pons-Guiraud, 2007 ; Schnuch, 2007). Utilisé en tant que cicatrisant et fixateur de parfums, dans les baumes pour les lèvres et les produits solaires, le baume du Pérou contient de nombreuses substances sensibilisantes comme l'acide cinnamique, le

benzoate de benzyle, le benzyle cinnamate, le farnesol, la vanilline et, en faible quantité, de l'alcool benzylique. La colophane est une résine naturelle issue du pin et autres espèces de conifères, composée d'acide résinique et de ses esters, les diterpènes et les sesquiterpènes. Dans les mascaras waterproof, les ombres à paupières, les fonds de teint, les cires dépilatoires, les brillantines, les rouges à lèvres (nacrés), les vernis à ongles (nacrés)..., elle est annexée sous le nom *colophonium*. Le FMI, étudié au cours de ce projet, est un mélange de sept molécules et d'un extrait fréquemment utilisé dans les produits cosmétiques et allergisants (Tableau 1). Introduit dans la BSE en 1977 par Larsen *et al.* il permet le diagnostic de 70 à 80 % des cas de sensibilisation aux molécules odorantes (Larsen, 1977). Il contient un extrait de mousse de chêne, contenant principalement l'évernine, extraite d'*Evernia Prunasti*, et trois grandes familles de terpènes : (i) - les dérivés cinnamiques : aldéhyde cinnamique, aldéhyde amylcinnamique et alcool cinnamique ; (ii) - les dérivés de l'eugénol : eugénol et isoeugénol ; (iii)- deux mono-terpènes linéaires : l'hydroxycitronellal et le géraniol. Ces molécules odorantes sont retrouvées dans de nombreux produits de consommation (Tableau 11) et la prévalence de l'allergie au FMI est comprise entre 2 et 11.5 % en Europe, pourcentage variant en fonction des populations étudiées (Tableau 12).

Tableau 11 : Fréquence des différentes molécules composant le FMI dans les produits de consommation (Buckley, 2007)

Nom INCI	PS (n=70)	PH (n=59)	PM (n=57)	PF (n=44)	Cos (n=39)	Deo. (n=17)	PD (n=14)	Total (%) (n=300)
Geraniol	19	26	15	36	18	12	0	126 (42 %)
Eugénol	13	26	4	22	6	6	3	80 (27 %)
Hydroxycitronellal	5	6	1	30	6	4	0	52 (17 %)
Isoeugénol	2	5	0	17	2	0	0	27 (9 %)
Cinnamyl alcohol	4	2	0	13	4	2	0	25 (8 %)
Amylcinnamaldéhyde	5	0	3	7	5	2	0	22 (7 %)
Cinnamaldéhyde	3	4	0	7	0	0	3	17 (6 %)
<i>Evernia Prunastri</i>	0	3	0	5	5	0	0	13 (4 %)

PS : produits de soin, PH : produits pour hommes, PM : produits ménagers, PF : parfums féminins, Cos : produits cosmétiques, Deo : déodorants, PD : produits dentaires.

En 2005, la BSE a été complétée par un second mélange appelé Fragrance Mix II, dont la composition a été proposée par Frosch *et al.* pour répondre à l'utilisation de nouvelles molécules douées de pouvoir sensibilisant (Frosch, 2005a ; Frosch 2005b). Ce dernier contient six molécules incluant le citronellol, le citral, la coumarine, le farnésol, l'hexyl cinnamaldéhyde et l'hydroxyisohexyl 3-cyclohexene carboxaldéhyde (HICC). De plus, l'HICC présentant une forte fréquence de sensibilisation dans la population générale, a également été introduit seul dans la BSE (depuis 1999, ce dernier aurait été la cause de plus de 1500 cas d'allergie aux parfums) ; il est plus connu sous le nom de Iral (Bruze, 2008).

Tableau 12: Résultats des études épidémiologiques décrivant la prévalence de l'allergie de contact aux FM déterminée par la positivité aux patch-tests; études rapportées depuis 1999 chez des patients testés pour suspicion de dermatite de contact allergique en Europe.

Localisation	Nombre de sujets	Population	Années	Prévalence (%)	Référence
Suède	3790	Patients	2000	6.9	(Lindberg, 2007)
Hongrie	3604	-	1998-1999	8.2	(Temesvari, 2002)
République Tchèque	12058	-	1997-2001	5.58	(Machovcova, 2005)
Slovénie	6129	Patients	1989-1998	5.9	(Lunder, 2000)
Allemagne	59298	Patients (service de dermatologie)	1996-2002	11.3	(Schnuch, 2004)
Allemagne	36961	Patients (service de dermatologie)	2005-2008	7.3	(Uter, 2010)
Autriche	2660	Patients	1997-2000	9.1	(Wöhrl, 2001)
Hollande	295	Patients avec une allergie aux parfums suspectée	2005-2007	5.8	(Van Oosten, 2009)
Hollande	1825	Patients	1998-1999	10.6	(Degroot, 2000)
Hollande	757	Patients (allergie aux produits cosmétiques suspectée)	1994-1998	14.8	(Hendriks, 1999)
Belgique	10128	Patients	1990-2005	9.1	(Nardeilli, 2008)
Portugal	2600	Patients	1989-1999	10.9	(Brites, 2000)
Grande-Bretagne	744	Patients	1994-1995	11.4	(Katsarma, 1999)
Danemark	16173	Patients	1985-2007	7.2	(Thyssen, 2008)
Europe	9663	Patients	2002-2003	7.1	(Uter, 2005)
Europe	9941	Patients	2004	7.6	(Hegewald, 2008)
Europe	18542	Patients	2005-2006	7.0	(Uter, 2009)

En 2011, le SCCS (*Scientific Committee on Consumer Safety*) faisant suite à une demande de la Commission Européenne a publié un rapport nommé : "*Opinion on fragrance allergens in cosmetic products*" en lien avec les allergies aux parfums et le classement des molécules odorantes pouvant être allergènes (SCCS, 2011). Les auteurs de ce rapport ont évalué l'ensemble des études cliniques, épidémiologiques, et expérimentales réalisées à ce

jour sur l'allergie aux composés odorants, et ainsi dégagé une liste comportant ; (i) – les allergènes établis, (ii) – les allergènes probables (iii) – les allergènes possibles. Cette étude confirme que les 26 allergènes recensés en 1999 s'avèrent comme les allergènes les plus pertinents, mais que de nombreuses autres molécules seraient également fréquemment incriminées dans le développement de la pathologie. En se basant uniquement sur les études cliniques, 82 substances ont été isolées (54 molécules chimiques et 28 extraits naturels) pour leur pouvoir sensibilisant. Plus spécifiquement, 12 molécules dont le farnésol, le (DL)-limonène oxydé, le linalool oxydé, l'HICC et 8 extraits naturels comme le nérol, et l'ambrettolide induiraient une forte fréquence de sensibilisation. Ces données ont été complétées par des études de l'IFRA sur l'animal (*International Fragrance Association*) qui ont recensé 59 substances odorantes (RIFM, 2009). En outre, ces données ont été intégrées dans des modèles *in silico* basés sur l'établissement de relations structure – activité, dans le but à terme étant de limiter l'expérimentation animale. Il reste néanmoins difficile de prédire le pouvoir sensibilisant des impuretés ou des produits de dégradation par cette technique. De plus, il a également été envisagé d'utiliser ces outils mathématiques pour prédire la dose limite de molécules à appliquer. Ainsi, trois molécules ont été principalement étudiées à savoir le cinnamaldéhyde, l'hydroxycitronellal et l'isoeugénol. Néanmoins, les premiers résultats obtenus ne sont pas en adéquation avec les études expérimentales (Fischer, 2011 ; Franot, 1994).

Le développement des marchés relatifs aux produits « naturels » ou aux produits « bio » a fortement modifié la composition des cosmétiques. En effet, de plus en plus de parfums composés d'extraits de plantes ont remplacé les molécules synthétiques. Possédant également des propriétés conservatrices, ces extraits permettent de s'affranchir de l'emploi de molécules plus traditionnelles comme les parabènes, néanmoins l'utilisation croissante de ces huiles essentielles s'est également accompagnée d'une augmentation de cas d'allergie de contact. En raison de la complexité de la composition de chaque huile essentielle (HE), pouvant contenir plusieurs centaines de molécules différentes, l'identification du ou des allergènes responsables reste difficile (Goossens, 2009). A titre d'exemple, l'essence de rose indexée sous le nom de *rosa centifolia*, contient dans des fortes proportions du citral, du farnésol et du linalool (Nardelli, 2009), molécules connues pour leur caractère allergisant. De plus, il a été reporté que les patients peuvent également présenter de multiples sensibilisations même à des produits jamais rencontrés. En effet, un allergène peut être commun à plusieurs HE. Par conséquent, des discussions sont en cours entre les professionnels de l'industrie des parfums (représentés par l'IFRA) et la Commission Européenne en vue d'améliorer la législation en vigueur et permettre aux consommateurs, une meilleure identification des produits en présence.

1.2. Réglementation européenne

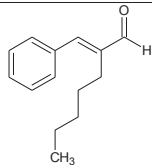
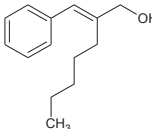
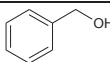
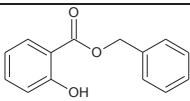
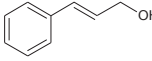
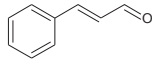
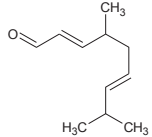
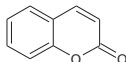
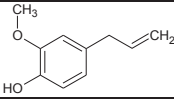
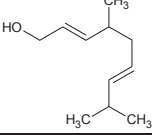
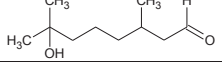
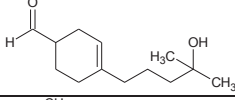
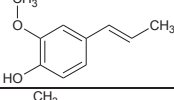
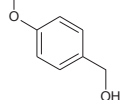
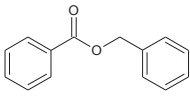
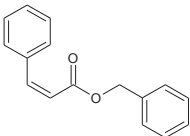
Les parfums sont codifiés par le Règlement des cosmétiques (CE) n°1223/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques. L'article 2, paragraphe 1, section A de ce dernier définit comme «Produit cosmétique, toute substance ou tout mélange destiné à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaire, ongles, lèvres et organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles».

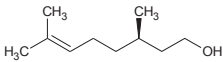
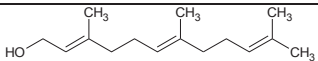
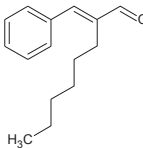
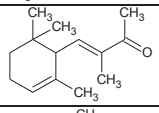
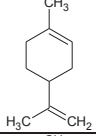
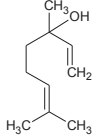
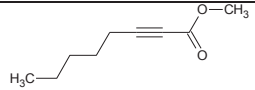
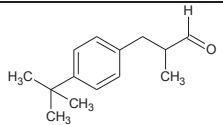
La directive 76/768/CEE reportée dans ce Règlement établit que «les compositions odorantes et aromatiques», et les matières les composants doivent être mentionnées sur le packaging du produit cosmétique par les termes «parfum» ou «arôme». Cette directive a pour but de protéger les secrets industriels, mais elle ne permet pas aux consommateurs de connaître avec précision les molécules auxquelles il est exposé. Pour pallier à ce manque d'information, en 1999, une liste de 26 substances fréquemment incriminées dans le développement d'allergies a été éditée. Lors de l'utilisation de ces substances, elles doivent être mentionnées sur le packaging des produits cosmétiques (Tableau 13) pour des concentrations supérieures à 0.001 % pour les produits non-rincés et à 0.01 % pour les produits rincés.

L'IFRA, cherchant à diminuer le risque d'allergies provoquées par les parfums, en analyse tous les composants pour aboutir à des recommandations. L'objectif est ainsi d'interdire ou de limiter de façon drastique l'utilisation de certaines molécules sensibilisantes. Ces rapports sont rendus au SCCS, qui rend publique des rapports. En 2011, il a notamment proposé de lister 89 substances au lieu de 26 et d'interdire 3 composés, l'HICC, et deux molécules présentes dans la mousse de chêne, l'atranol et le chloroatranol. Le texte de loi devrait être accepté par les députés en janvier 2015.

De plus, l'IDEA (*International Dialogue for the Evaluation of Allergens*) cherche à déterminer des méthodes d'évaluation des risques posés par les ingrédients de parfumerie, non seulement sur les allergies mais aussi sur les impacts endocriniens et reproductifs. Ces protocoles sont fondés sur l'exposition globale réelle des consommateurs. Ces méthodes ont pour but de déterminer la concentration maximale autorisée pour chaque molécule odorante tolérée par la population générale.

Tableau 13 : INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*), numéro CAS (*Chemical Abstract Service*) et formules chimiques des 26 substances odorantes reconnues pour leur pouvoir sensibilisant

Nom INCI	Formule chimique	Numéro CAS
Amyl Cinnamaldéhyde*		122-40-7
Amylcinnamyl alcohol		101-85-9
Benzyl alcohol		100-51-6
Benzyl salicylate		118-58-1
Cinnamyl alcohol*		104-54-1
Cinnamaldéhyde*		104-55-2
Citral		5392-40-5
Coumarin		91-64-5
Eugenol*		97-53-0
Geraniol*		106-24-1
Hydroxycitronellal*		107-75-5
Hydroxyisohexyl 3-Cyclo Hexene Carboxaldehyde		31906-04-4
Isoeugénol*		97-54-1
Amise alcohol		105-13-5
Benzyl benzoate		120-51-4
Benzyl cinnamate		103-41-3

Citronellol		106-22-9
Farnesol		4602-84-0
Hexyl cinnamaldéhyde		101-86-0
Alpha-Isomethyl Ionone		127-51-5
Limonene		5989-27-5
Linalool		78-70-6
Methyl 2-Octynoate		111-12-6
Butylphenyl Methylpropional		80-54-6
<i>Evernia Prunastri</i> *	-	90028-68-5
<i>Evernia Furfurea</i>	-	90028-67-4

* substances composant le FMI

2. L'eczéma allergique de contact - Généralités

2.1. Aspects cliniques de l'EAC

Cliniquement, l'EAC survient de 24 h à 96 h après l'exposition cutanée avec un haptène chez une personne déjà sensibilisée. Néanmoins, ces délais sont variables en fonction des individus. Les lésions primaires apparaissent au niveau de la zone de contact, mais souvent la pathologie évolue en s'étendant sur d'autres parties du corps. Le plus souvent la lésion d'eczéma se manifeste au contact direct entre la peau et l'allergène. Dans le cas des parfums, d'autres possibilités d'exposition existent. Le transfert d'allergènes peut se faire *via* : (i) - les mains sur le visage, l'EAC est alors qualifié d'ectopique, (ii) - un partenaire, l'EAC par procuration, (iii) - le contact de l'air, l'EAC aéroportée. Ainsi, le plus souvent, les individus peuvent développer un EAC aux parfums au niveau des paupières après vaporisation de leur eau de toilette au niveau de leur décolleté (Gossens, 2003).

Les lésions aiguës possèdent la forme de plaques érythémateuses et œdémateuses, à bords émiettés et mal délimités, prurigineuses. Sur cet érythème, plus ou moins infiltré, apparaissent des vésicules claires de petites tailles et suintantes. Après un certain temps, le

suintement s'arrête ; l'eczéma se couvre alors de croûtes et en l'absence de contact avec l'haptène, les plaques régressent spontanément en 7 à 10 jours (Figure 38). Néanmoins, en cas de persistance du facteur étiologique, l'eczéma devient chronique. Dans ces conditions, l'eczéma est sec, formé de plaques érythémato-squameuses, pigmentées, mal délimitées. Les squames peuvent être très fines et poussiéreuses ou, au contraire, épaisses et de grandes tailles. De plus, les nappes d'eczéma sont parcourues de stries de grattage (Saurat, 1990).



Figure 38 : Patients développant un eczéma allergique de contact au FMI.

2.2. Histopathologie de l'EAC

Les lésions primaires sont caractérisées le plus fréquemment, par une spongiose prédominante dans la couche basale de l'épiderme, résultant d'un œdème intercellulaire (exosérose) écartant les kératinocytes. Elle aboutit alors à la formation de vésicules spongiotiques (voire de bulles), chargées de cellules inflammatoires telles que les lymphocytes, les polynucléaires ou les éosinophiles. Les érosions post-vésiculeuses apparaissent comme des perforations de l'épiderme. Le derme superficiel est le siège d'un œdème intense, les capillaires sont dilatés et cernés par un infiltrat inflammatoire important.

Dans le cas d'eczéma chronique, les phénomènes de spongiose et de vésiculations sont réduits ; la couche cornée s'épaissit due à une multiplication exagérée des cellules épidermiques devenant parakératosiques, avec présence de croûtelles traduisant d'anciennes vésicules. Dans le derme, l'œdème et l'infiltrat sont plus discrets (Figure 39) (Krasteva, 1998).

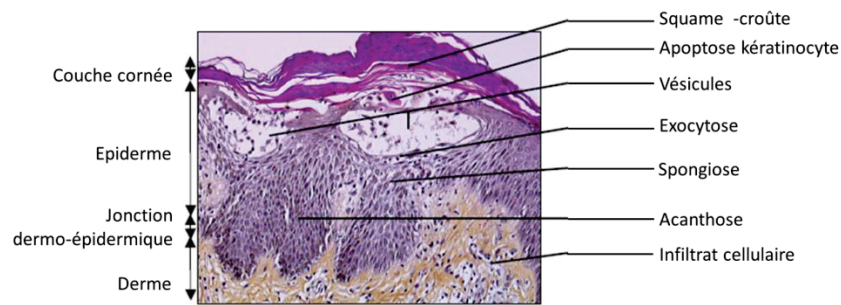


Figure 39: Coupe histologique de peau atteinte d'EAC aigu (coloration hématoxyline et éosine)

2.3. Les facteurs étiologiques de l'EAC

Le développement de la pathologie est influencé par de nombreux facteurs : (i) - la molécule et son application (Gerberick, 2004 ; Kimber, 2002), (ii) - les individus, et (iii) - les conditions environnementales (Giordano-Labadie, 1999; Saint-Mezard, 2003) (Figure 40).

En effet, les propriétés des haptènes vont dicter la survenue de la pathologie. Deux classes d'haptènes sont distinguées à savoir (i) - les haptènes dits «forts» induisant un EAC chez la majorité des personnes exposées (de Groot, 1988). Ce sont des chimiques expérimentaux absents dans la vie quotidienne (1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (DNFB), 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB), oxazolone) ; (ii) - les haptènes dits « faibles » sont les allergènes de contact les plus retrouvés et vont induire un EAC chez une minorité de personnes (1/1000). Les parfums appartiennent à cette famille d'haptènes (Belsito, 2000 ; Saint-Mezard, 2004). De plus, les facteurs interindividuels et notamment les prédispositions génétiques sont impliqués dans le développement de l'EAC. En outre, les facteurs environnementaux vont avoir une influence directe sur les propriétés structurales de la peau. En effet, l'altération par exemple de la fonction barrière du *stratum corneum*, entraîne une meilleure pénétration cutanée des haptènes.



Figure 40: Facteurs impliqués dans le développement d'un EAC

2.3.1. Caractéristiques physico-chimiques des haptènes

Comme il est abordé dans le chapitre précédent, la pénétration des molécules dans la peau dépend de nombreux paramètres. Les haptènes, molécules le plus souvent hydrophobes, de faibles masses moléculaires (< 500 Da), présentant des groupements réactifs, possèdent donc les caractéristiques requises pour pénétrer la peau. De plus, ces molécules sont reconnues par le système immunitaire, mais sont non immunogènes (incapables de l'induire), et peuvent se lier de façon covalente aux acides aminés d'une protéine du soi. Le plus souvent, la liaison s'établit par substitution nucléophile de la protéine vers un site électrophile de l'haptène (Figure 41) et les acides aminés impliqués sont les lysines, les cystéines, les méthionines, les tyrosines, les histidines et les tryptophanes possédant des résidus nucléophiles (Figure 42) (Britschgi, 2003). Les haptènes peuvent se fixer sur (i) - les molécules d'adhésion ou les récepteurs membranaires des protéines extracellulaires, (ii) - les peptides situés dans la poche des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I ou II, (iii) - les protéines intracellulaires du cytoplasme ou d'autres organelles après internalisation.

Afin de mieux définir les protéines cutanées réagissant avec l'haptène après exposition cutanée, Bauer *et al.* ont étudié la fixation du bromobimane, haptène fluorescent après fixation aux groupements thiols d'une protéine, par microscopie fluorescente

biphotonique. Ils ont ainsi montré que l'haptène se fixe au niveau des kératinocytes de la couche basale, et plus précisément au niveau de filaments de kératines K5 et K14 et plus particulièrement au niveau de leur cystéines 54. De façon intéressante, les auteurs ont également observé que les filaments modifiés sont alors expulsés de la cellule sous la forme de bourgeons, permettant l'exposition à de nouveaux épitopes (Bauer, 2011).

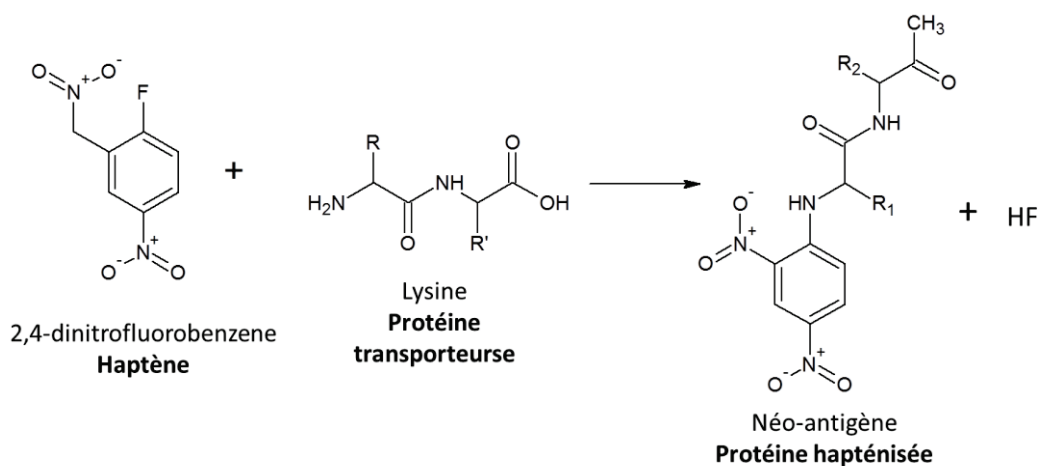


Figure 41: Réaction entre le 2,4-dinitrofluorobenzène et une lysine d'une protéine du soi pour former un nouvel antigène.

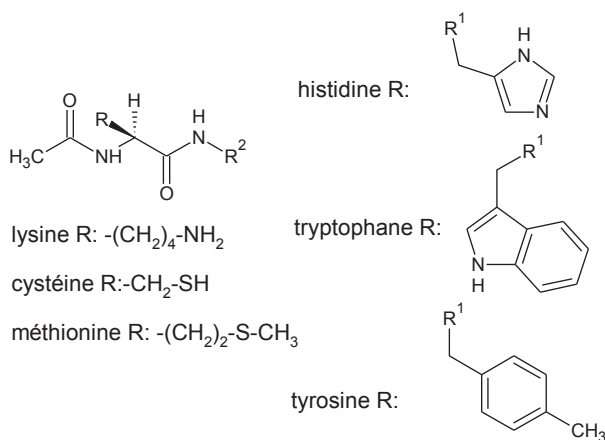


Figure 42: Principaux acides aminés nucléophiles des protéines

Cette liaison aux protéines du soi est due aux propriétés électrophiles des haptènes. Certaines molécules ne possèdent pas ces caractéristiques physico-chimiques mais vont les acquérir après transformation, en fonction des réactions mises en œuvre, ces composés sont appelés prohaptènes et / ou préhaptènes (Figure 43).

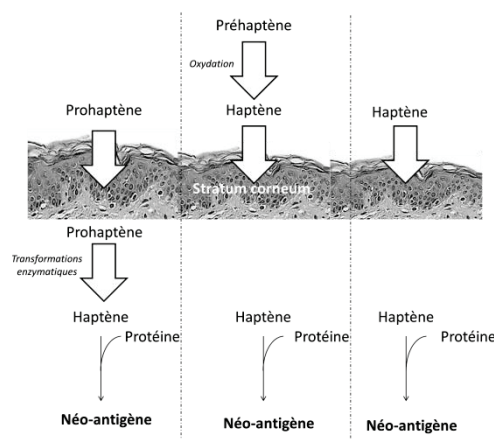


Figure 43: Voie d'activation des préhaptènes et prohaptènes

➤ Caractéristiques des préhaptènes et des prohaptènes

Les préhaptènes sont des molécules non sensibilisantes qui se transforment en métabolites actifs après avoir subi une réaction de photo-activation ou une activation au contact de l'air. Ces transformations aboutissent le plus souvent à la formation d'hydropéroxydes, composés très réactifs (Karlberg, 2013). Les prohaptènes sont des molécules non sensibilisantes, qui se transforment en métabolites actifs par biotransformation dans la peau. Cette étape de bioactivation, est réalisée par des enzymes détoxifiantes des kératinocytes et des cellules présentatrices d'antigènes (APC), telles que les enzymes du cytochrome P450, N-acétyltransférases, glutathion-S-transférases...) (Eilstein, 2008 ; Ott, 2009). Durant le processus de détoxification, les molécules subissent un cycle de transformation afin d'acquérir des propriétés hydrophiles, permettant ainsi une élimination plus facile par l'organisme. Ainsi, les mécanismes de détoxification induisent l'élimination d'un grand nombre de molécules de l'organisme, limitant ainsi le développement d'EAC (Figure 44). Néanmoins, quand la dose et / ou le temps d'exposition d'une molécule ou lorsque le processus de détoxification est défaillant, l'activation du système immunitaire est possible en présence de métabolites réactifs comme des aldéhydes ou des époxydes. Skazik *et al.* étudiant ces phénomènes, ont mis en évidence que les transporteurs membranaires de type MRP1/2 (*Multidrug Resistant-associated Protein*) responsables du transport des molécules chimiques à l'extérieur des cellules seraient également impliqués dans les mécanismes de tolérance vis-à-vis de pro-haptènes (Skazik, 2011).

Les processus d'oxydation de l'air ou les biotransformations, aboutissent souvent à la formation des mêmes composés et il peut être parfois difficile de classer les molécules entre prohaptènes et préhaptènes. A titre d'exemple, il a été montré que le géraniol était transformé en géraniol aldéhyde ou géraniol époxyde quelle que soit la voie d'activation (Hagvall, 2007 ; Hagvall, 2008). Aptula *et al.* ont ainsi proposé de classer les molécules

sensibilisantes selon les mécanismes chimiques mis en œuvre lors de la fixation à une protéine du soi et non par leur voie d'activation. Leur classement est basé sur les 5 types de réactions haptènes-protéines à savoir : (i) - les additions électrophiles de Michael, (ii) - les réactions avec les bases de Schiff, (iii) - les réactions d'acétylations, (iv) - les substitutions nucléophiles de classe II et, (v) - les substitutions nucléophiles aromatiques (Aptula, 2007).

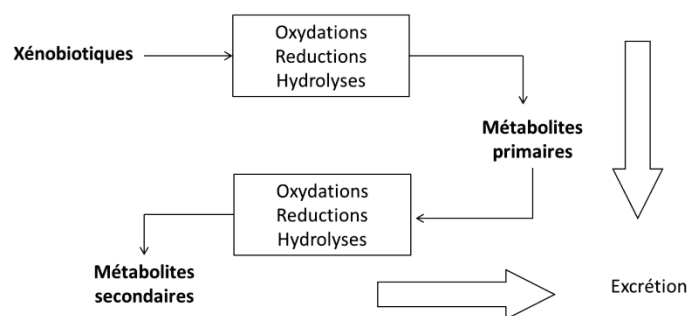





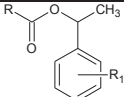
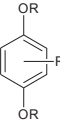
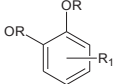
Figure 44: Mécanismes de détoxification des xénobiotiques dans la peau

➤ Parfums, haptènes, préhaptènes et prohaptènes

Afin de déterminer la liste des molécules odorantes présentant un pouvoir sensibilisant une étude de la Commission Européenne du programme Biomed a été menée sur 71 déodorants (Rastogi, 1998). Rastogi *et al.* ont ainsi identifié 226 molécules parmi lesquelles 84 contenaient des fonctions chimiques facilement oxydables associées à un pouvoir sensibilisant (Hagvall, 2011) (Tableau 14). Sur ces 84 molécules, 70 présentaient une fonction aldéhyde ou un précurseur de cette fonction montrant ainsi sa forte implication dans les mécanismes réactionnels de sensibilisation induites par les parfums (Rastogi, 1998).

Dans le FMI, toutes les molécules ne possèdent pas les mêmes groupements réactifs, et vont ainsi réagir différemment avec les protéines du soi. Certaines molécules comme l'alcool cinnamique, l'eugénol, l'isoeugénol ou encore le géraniol n'ont pas de pouvoir sensibilisant et acquièrent cette propriété après oxydation. Ainsi, l'alcool cinnamique est transformé en aldéhyde cinnamique présentant des propriétés sensibilisantes, le géraniol est oxydé pour donner un composé sensibilisant. Ces mécanismes font appel aux alcools et aux aldéhydes déshydrogénases (Figure 45) et se caractérisent par des équilibres chimiques entre les différents produits. Ainsi, dans le cas de l'alcool cinnamique la sensibilisation serait liée à la concentration en aldéhyde dans l'épiderme, qui dépendra de la sensibilité individuelle. En outre, Karlberg *et al.* ont également montré que l'alcool cinnamique et le géraniol pouvaient également être activés par oxydation dans l'air, ils peuvent ainsi être qualifiés de préhaptènes ou de prohaptènes (Karlberg, 2013). L'eugénol et l'isoeugénol, également prohaptènes, vont subir un cycle de transformation encore méconnu, et devenir des haptènes.

Tableau 14 : Fonctions chimiques des molécules odorantes et leur mécanisme réactionnel mis en œuvre au cours de la sensibilisation

Familles chimiques	Structures	Substituants	Mécanismes de réaction	Exemples de parfums
Aldéhydes		R= alkyle, aryle	Substitution nucléophile	Hydroxycitronellal
Cétones		R, R1= alkyle, aryle	Substitution nucléophile	Alpha-Isomethyl Ionone
Aldéhydes, esters et cétones α, β insaturés		R= H, C, N, OR R1=pas d'hétéroatomes R1 =pas aryle sauf si R=H	Addition de Michael	Cinnamaldéhyde
Phényl esters		R= alkyle, aryle	Addition de Michael	Benzyl benzoate
Hydroquinones et précurseurs		R= alkyles, H	Addition de Michael	Primine
Catéchols et précurseurs		R= alkyles, H	Addition de Michael	Eugénol

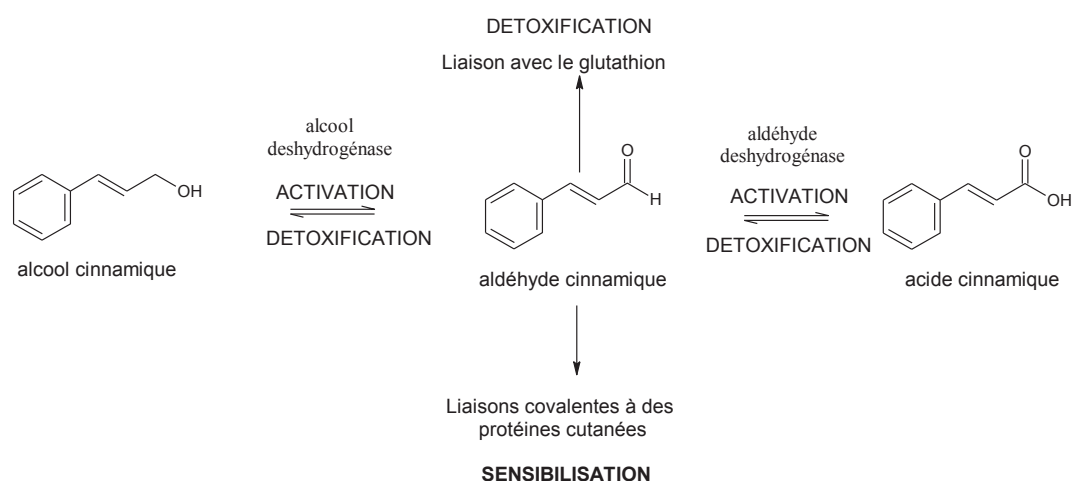


Figure 45: Transformations enzymatiques de l'alcool cinnamique en aldéhyde cinnamique puis en acide cinnamique (Gossens, 2003)

2.3.2. Effets immunologiques des haptènes

Les allergènes possèdent deux propriétés caractéristiques, ils sont adjuvants (propriété irritante) et antigéniques. Ils activent ainsi à la fois l'immunité innée et adaptative, à la différence des molécules irritantes qui activent uniquement l'immunité innée, ou encore des antigènes protéiques qui induisent une réponse immunitaire en présence de signaux adjuvants extérieurs. L'activation de l'immunité innée par les haptènes est liée à leurs

caractères pro-inflammatoire et toxique, et joue un rôle clé dans la sensibilisation des individus aux haptènes.

En effet, cette phase est nécessaire pour l'activation et la migration optimale des cellules dendritiques (DCs) cutanées transportant l'allergène vers les ganglions, où l'haptène sera présenté aux LTs (Dudda, 2004 ; Edele, 2008).

2.3.2.1. Mécanismes d'activation de l'immunité innée

En plus de générer de nouveaux motifs antigéniques, les haptènes conduisent à la production et / ou au relargage de nombreux médiateurs inflammatoires (cytokines / chimiokines) par les cellules cutanées. Les mécanismes sous-jacents restent largement méconnus et seraient en partie consécutifs aux stress électrophile et oxydatif, générés au sein de la cellule. Comme mentionné ci-dessus les haptènes ne peuvent être biodégradés, et doivent donc être détoxifiés. Il y a alors production de nombreuses espèces réactives à l'oxygène (ROS), qui favorisent l'activation des voies intracellulaires de l'inflammation. Alternativement, celles-ci peuvent être également activées suite à la reconnaissance directe ou indirecte des haptènes par les récepteurs de danger (récepteurs *Toll-like* (TLR), *NOD-like* (NLR), *C-Lectin* (CLR)) qui sont présents à la surface ou à l'intérieur des cellules (Schmidt, 2010). Une reconnaissance directe des *Pattern Recognition Receptor* (PRR) a été prouvée à ce jour seulement pour certains métaux comme le nickel, qui provoque l'activation du TLR4 humain. Le 2,4,6- trinitrochlorobenzène (TNCB) active indirectement les TLR2 et les TLR4 *via* la dégradation d'acide hyaluronique. De façon plus générale, en provoquant la mort de la cellule (qui meurt par défaut de détoxification), les haptènes induisent le relargage de tout un ensemble de médiateurs de dommages cellulaires (appelés DAMP pour *damage-associated molecular pattern*), qui activent directement les PRRs. Parmi ces DAMPs, l'ATP libérée stimule les récepteurs purinergiques P2X7 qui sont exprimés sur les cellules voisines saines. Ceci conduit alors à l'activation du complexe multi-protéique de l'inflammasome, *via* le récepteur NLRP3, qui est constitué entre autres de l'enzyme caspase 1, laquelle est responsable de la production de deux cytokines pro-inflammatoires majeures dans l'initiation de l'EAC : l'IL-1b et l'IL-18 (Webber, 2010).

Il est intéressant de noter que le facteur de transcription NRF2, ou NFE2L2 (*Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2*), qui est codé par le gène NFE2L2, jouerait un rôle important dans la protection de la cellule vis-à-vis du stress électrophile et oxydatif induit par les haptènes. Nrf2 est activé suite à la fixation d'espèces réactives ou d'un haptène sur les résidus cystéines de son répresseur naturel, appelé Keap 1, ce qui engendre sa translocation dans le noyau et sa fixation sur des éléments de réponse antioxydante (ARE : *Antioxidative Response Element*) (Copple, 2008 ; 2010 ; Dinkova-Kostova, 2005; Kensler,

2007). Ces éléments sont situés en amont du promoteur de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées (i) - dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques (comme l'enzyme NADPH quinone oxydoréductase NQO1 ; la glutathion S-transférases (GST)...), (ii) - dans les systèmes de défenses contre l'oxydation (comme la superoxyde dismutase, la catalase...), ou encore, (iii) - dans les processus oxydatifs conduisant à des fonctions cytoprotectrices majeures de la cellule : autophagie, réponse aux protéines mal repliées et du stress du réticulum endoplasmique, activation de la réponse inflammatoire via l'inflammasome, biogénèse mitochondriale, apoptose... (Natsh, 2008 ; 2010). Ainsi, aujourd'hui il paraît évident qu'il existe une véritable analogie entre les mécanismes d'activation de l'immunité innée par les allergènes chimiques et ceux induits par des agents infectieux (Figure 46).

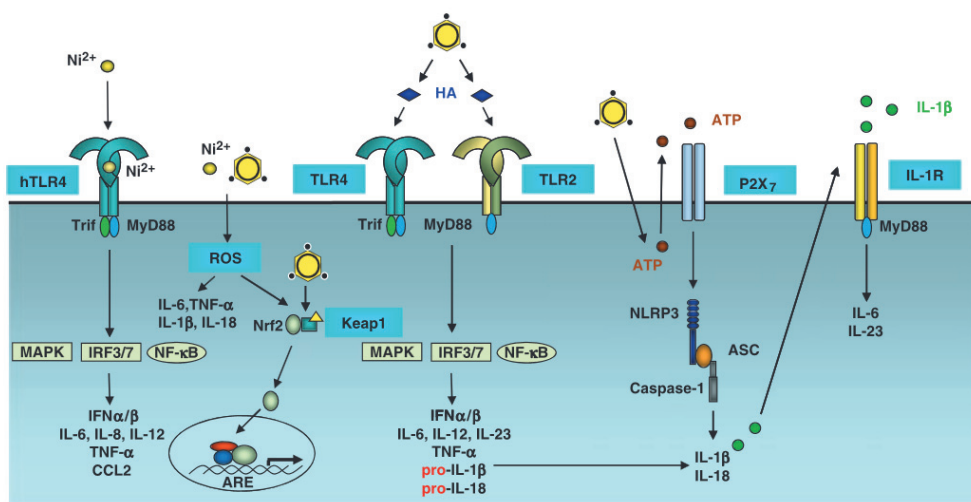


Figure 46: Réponse immunitaire innée induite par un allergène de contact d'après Martin *et al.*

Le Nickel interagit avec le TLR4 pour induire un signal inflammatoire, tandis que le TNCB, active indirectement le TLR2 et TLR4 via la génération de fragments d'acide hyaluronique. Ces deux types d'allergènes induisent la production de dérivés réactifs de l'oxygène, ce qui contribue à l'inflammation cutanée. Les allergènes de contact peuvent activer Nrf2 soit via un stress oxydatif, soit par modification chimique de cystéines sur la molécule Keap 1. Ils peuvent également induire la production d'ATP par les cellules cutanées. L'ATP stimule le récepteur purinergique P2X7, qui active la protéine NLRP3 de l'inflammasome, l'ensemble aboutissant à la production de cytokines et chimiokines inflammatoires (Martin, 2011).

2.3.2.2. Mécanismes d'activation de l'immunité adaptative

L'induction d'une réponse immunitaire adaptative nécessite la présentation d'un complexe molécule / peptide / CMH-I ou molécule / peptide / CMH-II aux LTs naïfs par les APCs. Plusieurs modes de reconnaissance des molécules chimiques par les LTs sont proposés :

(i) - l'haptène ou ses métabolites se lient de façon covalente aux protéines du soi, générant ainsi des peptides hapténisés qui sont ensuite présentés par les molécules du CMH aux récepteurs T (appelés TCR) des LTs (Weltzien, 2014) ;

(ii) - d'après le pi-concept, l'haptène ou ses métabolites interagissent directement avec le TCR et la molécule du CMH selon des liaisons physiques non covalentes, réversibles, sans métabolisation préalable. Cette voie d'interaction directe a été décrite lors de l'allergie aux médicaments comme le sulfaméthoxazole, la lidocaïne, la carbamazépine... (Pichler, 2010) ;

(iii) - l'haptène en se fixant sur de nombreuses protéines intracellulaires modifie la nature des peptides présentés dans la poche à peptides, ce qui favoriserait ainsi la présentation d'un nouveau répertoire de peptides du soi (Reantragoon, 2012 ; Pompeu, 2012).

3. Physiopathologie de l'eczéma allergique de contact

Une réaction d'hypersensibilité retardée s'établit en deux phases principales à savoir la phase de sensibilisation et la phase de déclenchement de la pathologie (Figure 47).

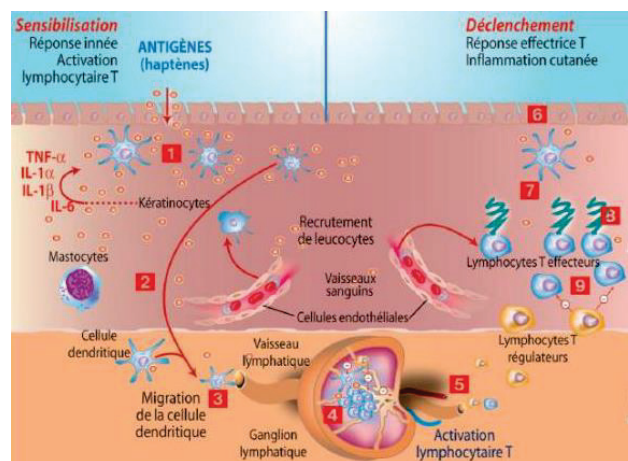


Figure 47: Représentation des deux phases principales impliquées dans le développement d'un EAC.

L'application épicutanée de l'antigène induit une activation du système immunitaire inné cutané associé à la migration et à la maturation des cellules dendritiques qui présentent l'antigène aux lymphocytes T dans le ganglion drainant. Ces cellules dendritiques activent les lymphocytes T effecteurs qui vont ensuite recirculer en périphérie. Lors d'un deuxième contact avec le même haptène, les LTs spécifiques sont recrutés dans la peau et activés. Les LTs effecteurs sont responsables de la mise en place de l'inflammation et de la lésion d'eczéma.

3.1. Etudes des différentes phases de l'EAC

3.1.1. Phase de sensibilisation

Les haptènes sont pro-inflammatoires et activent l'immunité innée selon les mécanismes décrits précédemment. Le déclenchement de ses signaux de danger induit la migration et l'activation de DCs. L'haptène ou le complexe haptène - protéine est internalisé par la DC et exprimé dans les peptides du CMH de classe I ou II à la surface membranaire. Lors de ce processus, la DC migre de la peau vers les ganglions lymphatiques. La

présentation aux LTs CD4⁺ et LTs CD8⁺ est réalisée dans la zone para corticale (Kissenpfennig, 2005). Les LTs effecteurs vont alors proliférer, avant de regagner le sang *via* le canal thoracique, pour patrouiller ensuite entre les différents organes lymphoïdes et les tissus périphériques tels la peau. Chez l'Homme, cette phase de sensibilisation s'établit entre 10 à 15 jours. Cliniquement, cette étape est asymptomatique (Vocanson, 2009b).

3.1.2. Phase de révélation

Lors d'un second contact avec le même allergène, les LTs CD8⁺ ou CD4⁺ mémoires spécifiques, qui ont survécu à l'activation initiale, sont alors recrutés sur le site de ré-exposition. A ce niveau, ils sont réactivés suite à la reconnaissance de motifs hapténisés présentés à la surface des cellules de la peau, comme les kératinocytes. Ils y répondent alors en produisant des quantités massives de médiateurs inflammatoires tels que l'Interféron gamma (IFN- γ), mais aussi des protéases cytotoxiques comme le couple granzyme B / perforine, ou encore en exprimant des récepteurs de nécrose tel que Fas-ligand. Tous ces médiateurs précipitent l'apoptose des kératinocytes hapténisés, qui est une des caractéristiques histologiques majeures de l'EAC. Il s'en suit une cascade inflammatoire qui aboutira à l'infiltration sur le site de nombreuses cellules inflammatoires innées, qui aideront à façonner la formation de la lésion d'eczéma. Il a été décrit que certains macrophages cutanés et autres neutrophiles joueraient un rôle majeur dans l'induction de cette lésion aiguë d'eczéma. En outre, les LTs CD8⁺ (il n'est pas possible de déclencher la réaction d'eczéma dans des modèles murins expérimentaux qui sont déficients en LTs CD8⁺ (Viraben, 2009)), sont considérés comme les principaux effecteurs dans le développement de la lésion. La lésion d'EAC persiste quelques jours puis disparaît grâce aux mécanismes de régulation. Cette phase de régulation de la pathologie, est étroitement liée à la clairance de l'haptène dans la peau et à l'activation des LTs CD4⁺ (Cavani, 2000).

3.2. Différence de sensibilisation après contact avec un haptène fort ou faible

L'EAC résulte de l'enchaînement successif de la phase de sensibilisation et de la phase de révélation. Lors du contact avec un haptène fortement sensibilisant, la pathologie peut se développer après un contact unique, l'EAC est alors qualifié de primaire. Ce phénomène est dû à la longue persistance de l'allergène dans la peau, permettant le recrutement et l'activation de LTs CD8⁺ activés dans les organes lymphoïdes quelques jours plutôt (Saint-Mezard, 2003).

Les haptènes faibles, au contraire des haptènes forts, sont en général peu pro-inflammatoires, et donc de ce fait les individus exposés à ce type de molécules ne développent que très rarement une sensibilisation (Gerberick, 2007). Ils conduisent plutôt à

une période de tolérance, période pendant laquelle l'individu ne peut se sensibiliser à une molécule fortement réactive, en raison de l'activation de mécanismes de tolérance impliquant des LTs CD4⁺ régulateurs / tolérogènes (Vocanson, 2009a). Il est intéressant de noter, qu'à l'instar d'un haptène faible, l'exposition d'un individu à de très faibles doses d'un haptène fort ne conduit pas au développement d'une réponse allergique, mais également à un état de tolérance (Steinbrink, 1996). En effet, à faibles doses, les haptènes forts ne sont pas capables d'induire une activation efficace de l'immunité innée, et donc l'activation de précurseurs T spécifiques d'haptènes. Les LTs CD4⁺ régulateurs / tolérogènes assurent un rôle prédominant pour prévenir l'activation des LTs CD8⁺ effecteurs, et la sensibilisation des individus, ceci en contrôlant l'activation de l'immunité innée et en limitant l'expansion du pool de cellules effectrices (Vocanson, 2006). Un défaut d'activation des LTs CD4⁺ régulateurs / tolérogènes ou une réaction inflammatoire (immunité innée) très forte qui rendrait les précurseurs de LTs CD8⁺ spécifiques réfractaires à la régulation par les LTs CD4⁺ régulateurs / tolérogènes, seraient les deux éléments qui précipiteraient la sensibilisation des individus et le développement de la réponse allergique.

3.3. Mécanismes mis en jeu lors de la phase sensibilisation

3.3.1. Le rôle central des DC cutanées

3.3.1.1. Les différentes populations de DCs cutanées et leur rôle

Il existe au sein de la peau différentes sous-populations de DCs qui assurent un rôle de sentinelle à cette interface, en criblant l'ensemble des antigènes pénétrant à ce niveau. Le phénotype et les fonctions des DCs cutanées ont fait depuis toujours l'objet d'intenses recherches, en raison de leur rôle prédominant dans le développement des réponses immunes et / ou de l'EAC. Il existerait tant chez l'homme que chez la souris au moins 4 sous-populations de DCs qui résident ou transitent dans la peau, incluant les cellules de Langerhans qui pavent l'épiderme, ainsi que différentes sous-populations de cellules dendritiques dermiques (dDCs) (Lenz, 1993 ; Nestle, 1993 ; Zaba, 2007 ; Haniffa, 2012) ou autres mono-DCs dérivés des monocytes sanguins et infiltrant la zone inflammatoire (Tamoutounour, 2013) (Figure 48).

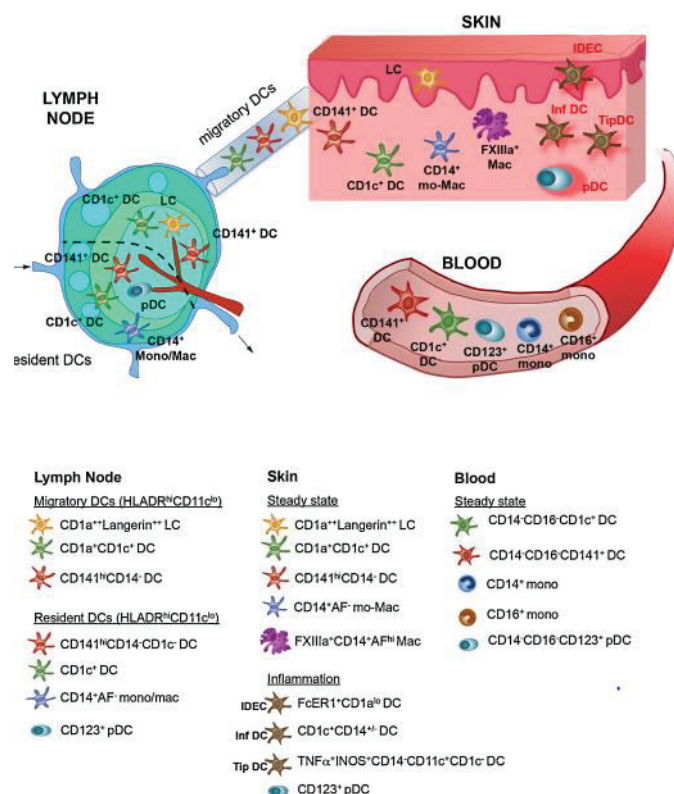


Figure 48: Distribution des cellules dendritiques humaines, des monocytes et des macrophages de la peau, du sang et des ganglions lymphatiques. Les changements survenant en phase d'inflammation sont indiqués en rouge. pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes ; Mac : macrophages, Mono : monocytes ; mo-Mac : macrocytes dérivés de monocytes ; Inf DC : DCs inflammatoires ; IDEC : cellules dendritiques épidermiques inflammatoires ; TipDC : cellules dendritiques produisant du TNF α et iNOS (Haniffa, 2014).

Durant de nombreuses années, les cellules de Langerhans (LCs) ont été considérées comme les principales cellules présentatrices de la peau impliquées dans la phase de sensibilisation et le développement de l'EAC. Néanmoins, avec le développement d'animaux transgéniques dans lesquels il est possible de dépléter de façon constitutive ou conditionnelle ces cellules, le rôle majeur joué par certains dDCs (exprimant le marqueur Langerine (à l'instar des LCs) ou le marqueur CD11b⁺) a été mis en lumière. Au contraire, en fonction des travaux et des modèles utilisés (type d'haptène, dose administrée...) il a été décrit que les LCs joueraient soit un rôle activateur, soit un rôle tolérogène, soit qu'elles ne seraient pas indispensables dans le développement de la réaction inflammatoire (Kissenpfennig, 2005 ; Kaplan, 2005 ; Edelson, 2010 ; Bennett, 2007 ; Noordegraaf, 2010 ; Igyarto, 2009).

Pour réconcilier l'ensemble de ces hypothèses, plusieurs théories évidences mettent en exergue aujourd'hui qu'en fonction de la dose et de la nature de l'haptène (clés pour l'activation des mécanismes de l'immunité innée), les LCs assurent des fonctions opposées, illustrant parfaitement une des propriétés majeures de ces cellules immunes, à savoir la plasticité (Gomez de Agüero, 2012).

3.3.1.2. Internalisation des haptènes

Les DCs résidentes dans la peau à l'état immature, peuvent facilement internaliser l'haptène *via* la micro / macropinocytose. Elles expriment sur leur membrane des récepteurs endocytaires (Langherine/CD207, DEC-205/CD205, DC-SIGN/CD209), des récepteurs « scavenger » ou des récepteurs Fc (FcεRI, FcεRII, FcγRI, FcγRII, FcαRI) et peuvent ainsi facilement internaliser les haptènes. De plus, les haptènes hydrophobes, pourraient pénétrer directement dans les DCs et se conjuguer avec des protéines intra-cytoplasmiques (Valladeau, 2005 ; Geissmann, 2001 ; Regnault, 1999) (Figure 49).

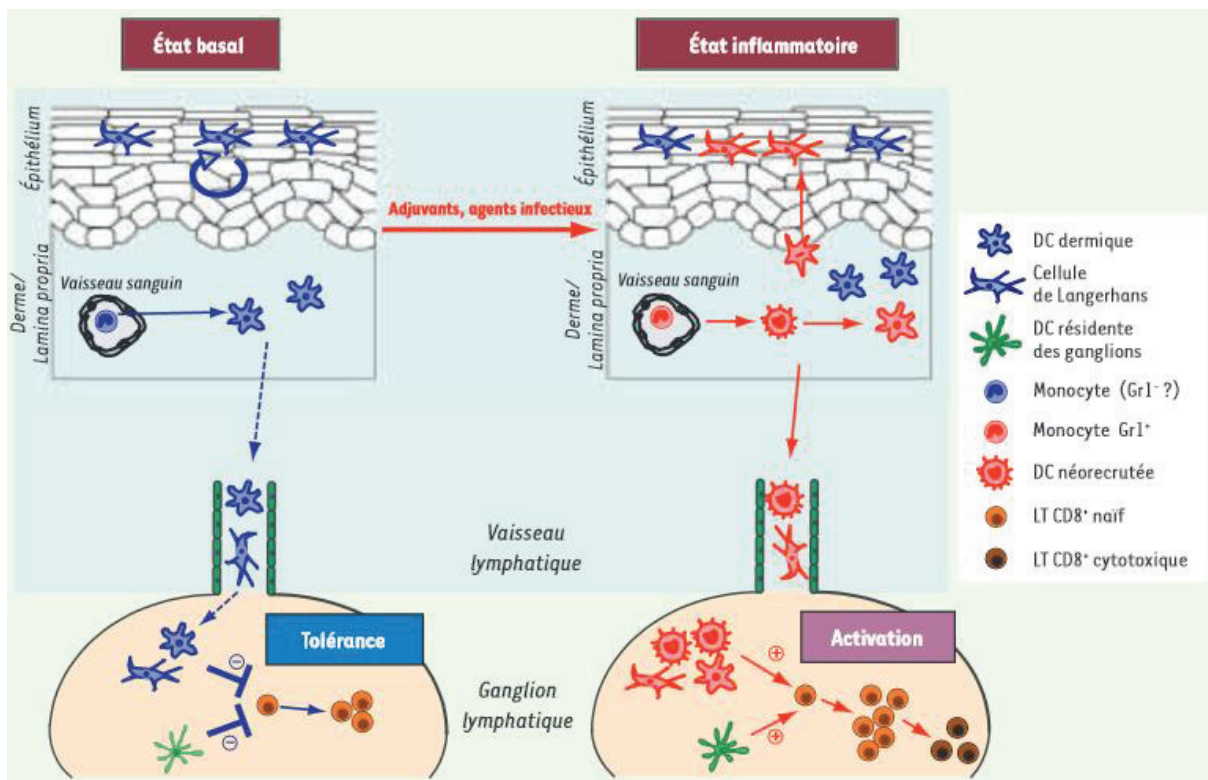


Figure 49: Propriétés fonctionnelles des DCs cutanées. Les DCs résidentes de la peau migrent continuellement dans les ganglions lymphatiques pour présenter les Ag et pourraient participer au maintien ou à l'induction de tolérance périphérique. En situation d'inflammation, des monocytes Gr1⁺ migrent dans le derme où ils peuvent se différencier en macrophages tissulaires ou en DCs capables soit de migrer rapidement dans les ganglions drainants, soit en LCs. Les récepteurs CCR2 et CCR6 et leurs ligands respectifs (CCL2/CCL13 et CCL20) induiraient la migration séquentielle des précurseurs de DCs du sang dans le derme, puis du derme dans l'épiderme. Les DCs néo-recrutées sont responsables de l'activation de LT CD8⁺ spécifiques et de leur différenciation en LTs cytotoxiques dans les ganglions lymphatiques drainants. Les DCs résidentes des ganglions lymphatiques pourraient également présenter l'Ag aux LT CD8⁺ (Le Borgne, 2007).

3.3.1.3. Migration des DCs hapténisées de la peau vers les ganglions lymphatiques

De nombreux investigateurs se sont attachés à comprendre comment les DCs cutanées migrent vers les ganglions drainants après exposition à un haptène. Ceci a particulièrement bien été décrit pour les LCs. Ainsi, pour rejoindre les ganglions lymphatiques, les LCs se détachent des kératinocytes, traversent la jonction dermo-épidermique, et migrent dans le derme à travers la matrice extracellulaire du derme pour

rejoindre les ganglions drainants. Ce processus est régulé par la sécrétion de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β , le TNF- α , et IFN- γ (Wang, 1996 ; Enk, 1993). Les LCs et les kératinocytes sont liés par les E-cadhérines. Sous l'action de l'IL-1 β et du TNF- α , une réduction de la production de E-cadhérine est observée, permettant un décrochage des LCs (Schwarzenberger, 1996). Cette étape s'accompagne en outre de changements phénotypiques incluant une inhibition des récepteurs de chimiokines CCR1, CCR2, CCR5 et CCR6 qui favorisent le recrutement des LCs dans la peau (Dieu, 1998).

Pour continuer leur chemin dans le derme, les LCs sécrètent des enzymes protéolytiques de type métalloprotéinases (MMP3 and MMP9) qui vont cliver les macromolécules de la jonction épidermique (Gearing, 1994). Les LCs vont aussi exprimer des molécules d'adhésion de types CD54, l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ et différentes isoformes du récepteur hyaluronate CD44 (Price, 1997 ; Weiss, 2001). Leur migration répond également à un gradient de chimiokines produites au cours de la réponse inflammatoire, impliquant les molécules CCL19 et CCL21 ainsi que CXCL12, qui attirent les LCs vers les ganglions en se fixant respectivement sur leurs récepteurs CCR7 ou CXCR4 qui sont surexprimés sur ces cellules au cours de leur transit (Kabashima, 2007). Enfin, la migration sera dictée par la production de médiateurs de type prostanoïdes, et notamment la sécrétion de prostaglandines PGE2 ou encore de leukotriènes B4 (Kabashima, 2003 ; Cevikbas, 2007).

3.3.1.4. Maturation des DCs cutanées

Cette étape intervient après l'internalisation de l'haptène pendant ou après la migration des DCs vers les ganglions lymphatiques. La maturation pourrait être initiée lors du décrochage des LCs et des kératinocytes au niveau des E-cadhérines (Trombetta, 2005). Les molécules du CMH de classe I ou II migrent alors des compartiments lysosomals vers la membrane plasmique, l'expression des molécules de co-stimulation et des récepteurs de chimiokines est augmentée, le processus de traitement des antigènes lysosomales est activé, et des cytokines immunostimulantes sont libérées (Jiang, 2007). La maturation des DCs s'accompagnent également de la diminution des récepteurs responsables de l'internalisation comme les récepteurs de mannose ou de type FcR et les granules de Birbeck disparaissent des DCs prévenant ainsi l'internalisation des antigènes (Garret, 2000). Les DCs expriment également des molécules de co-stimulation de type CD80, CD86, CD40, et CD83, des molécules d'adhésion CD54 et CD58 et les récepteurs de chimiokines CCR4, CCR7 et CXCR4, impliqués dans le processus de migration des DCs. De plus, les DCs produisent également des cytokines immunostimulantes comme IL-6 ou le TNF- α qui sont nécessaires à l'activation des précurseurs des LTs spécifiques de l'haptène (Riemann, 2005).

3.4. Rôle des LTs

3.4.1. Activation des LTs spécifiques de l'haptène

L'activation des LTs implique trois signaux distincts : (i) - l'interaction des TCR et du complexe haptène-peptide (voir 2.3.2.2), (ii) - l'expression des molécules de co-stimulation par les DCs, (iii) - la sécrétion de cytokines par les DCs. L'absence de l'un de ces trois signaux peut conduire à l'anergie ou à la mort du LT engagé par son TCR (Figure 13).

Initialement, les LTs vont interférer avec les DCs par contact physique qui provoque une modification de la membrane cellulaire et ainsi la formation du complexe TCR / molécules du CMH et l'interaction des molécules de co-stimulation et de leurs ligands apparentés. Les molécules d'adhésion comprenant les intégrines (CD54 et CD58) et les lectines (DC-SIGN) vont respectivement interagir avec le LFA-1 (CD11a / CD18), les intégrines $\alpha\beta 2$, le CD2 et l'ICAM-3/2, molécules exprimées à la surface des LTs (Saalbach, 2007). Un réarrangement du cytosquelette par polymérisation d'actine et par activation du ZAP-70 et de la protéine Vav-1, génère une zone centrale riche en complexe peptide du CMH / TCR qui est entourée par un anneau d'intégrines appelé cluster d'activation supramoléculaire (SMAC) (Krawczyk, 2002).

Les molécules de co-stimulation les plus exprimées par les DCs sont les molécules CD80, CD86 et CD40. CD80 et CD86 interagissent avec les récepteurs activateurs CD28 à la surface des LTs (Kondo, 1996). Cette liaison permet de stabiliser les transcrits d'ARNm d'IL-2 qui viennent d'être générés suite à l'activation des récepteurs T et conduit à la sécrétion de cette cytokine qui joue un rôle majeur dans la prolifération des clones T spécifiques d'haptènes. En outre, l'engagement de CD28 conduit à l'expression de la protéine Bcl-XL, qui est une protéine anti-apoptotique et qui empêche la mort trop rapide des LTs qui viennent d'être activés (Boise, 1995). Ils existent d'autres couples de molécules de co-stimulation comme CD40 / CD40 - Ligand, RANK / RANK-Ligand ou OX40 / OX40-Ligand (Chen, 1999), qui délivrent chacun des signaux d'activation positifs pour la cellule. A l'inverse, pour éviter une activation excessive, des signaux de co-stimulation négatifs sont reçus par la cellule T suite à l'engagement des molécules CD80 - CD86 des DCs avec cette fois les récepteurs inhibiteurs CTLA-4. Les couples inhibiteurs PD-L1 / PD-1, PD-L2 / PD-2 (Greenwald, 2002) participent également à prévenir et / ou limiter l'activation des précurseurs T spécifiques et donc favorisent les processus de tolérance (Tsushima, 2003).

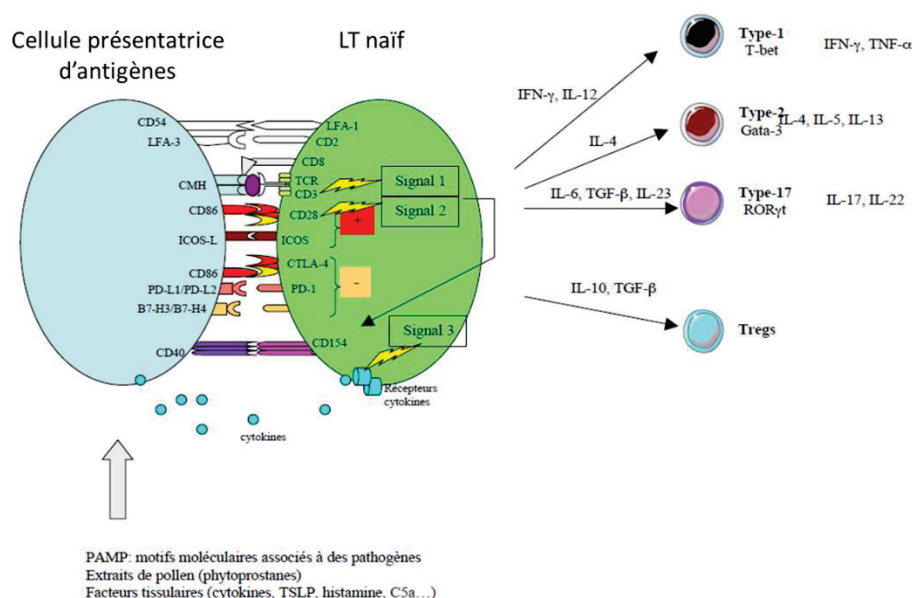


Figure 50: L'activation des LTs naïfs par les cellules présentatrices d'antigènes nécessite trois types de signaux distincts (TCR, co-stimulation et cytokines) et conduit au développement des différentes lignées de cellules T dotées de propriétés effectrices singulières. L'orientation du développement des LTs sera fonction des signaux environnementaux, de la nature de l'antigène et de la cellule présentatrice d'antigènes.

3.4.2. Le rôle des différentes populations de LTs

Les LTs spécifiques d'haptènes peuvent se différencier en cellules productrices de cytokines de différentes natures, suite à la présentation de motifs hapténisés par les DCs cutanée. Ainsi, trois types principaux de cellules ont été décrits. Les cellules de type-1 (LTs $CD4^+Th1$ ou LTs $CD8^+Tc1$) qui sécrètent de l'IFN- γ , de l'IL-2 et / ou du TNF- α . Au contraire, les cellules de type-2 produisent essentiellement de l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et / ou de l'IL-5. Enfin, les cellules de type-17 sont caractérisées par leur sécrétion d'IL-17A, d'IL-17F, d'IL-21 et éventuellement d'IL-22. A noter qu'il a été décrit récemment de nouvelles classes de différenciation des LTs, de type-22, de type-9.

Au cours de la réponse induite par les haptènes, il a été montré que les LTs $CD4^+$ et LTs $CD8^+$ spécifiques d'haptènes sécrètent un mix de cytokines de type-1 (majoritairement), de type-2 et aussi de type-17 (Sad, 1995 ; Chen, 2007). La différenciation des LTs naïfs est directement influencée par la nature du profil sécrétoire des DCs. Ainsi la production IL-12 par les DCs est associée à la différenciation en LTs Th1. La sécrétion d'IL-4 est nécessaire à la différenciation en LTs Th2, et la différenciation en LT de type-17 est promue par la sécrétion d'IL-1, d'IL-6 et d'IL-23 (Chen, 2007 ; Korn, 2007). Ainsi, les différents profils de différenciation des LTs semblent dépendre du type de DCs impliquées dans la présentation, du type d'antigènes, du microenvironnement tissulaire (TSLP, histamine, ...) (Traidl-Hoffmann, 2005).

La polarisation de type-1 (Th1), et notamment les cellules CD8⁺ Tc1 jouent un rôle crucial dans l'initiation de la réponse allergique, *via* l'induction d'apoptose des kératinocytes hapténisés. Ces cellules sont activement régulées dans les ganglions drainants par l'activation de LTs CD4⁺ Th2 (Xu, 1996) mais aussi de LTs CD4⁺ régulateurs exprimant le facteur de transcription FoxP3 et le marqueur ICOS⁺ (Vocanson, 2010 ; Bour, 1995).

3.4.3. Migration des LTs spécifiques de l'haptène dans le sang et la peau

Après leur activation, les LTs effecteurs qui ont survécus à l'activation initiale et à la phase de contraction clonale, ainsi que certaines sous-populations exprimant un caractère de cellules mémoires, quittent les ganglions lymphatiques à travers les vaisseaux lymphatiques efférents pour circuler dans le sang, puis dans l'ensemble des tissus de l'organisme. Ce phénomène est associé à des modifications de l'expression de chimiokines et des récepteurs d'adressage. Seuls les LTs exprimant le récepteur CCR7⁺ pourront revenir dans les ganglions lymphatiques. Cette propriété est l'apanage de sous-populations de cellules mémoires dites « mémoires centrales » (ou Tcm). Au contraire, d'autres sous-populations dites « mémoires effecteurs » (Tem) re-circuleront principalement entre le sang et les tissus périphériques. Outre la domiciliation, les sous-populations de Tcm et de Tem s'opposent également sur leurs fonctions. Les Tcm possèdent des propriétés effectrices modestes (elles sécrètent peu de cytokines inflammatoires telles que l'IFN- γ) mais présentent un haut potentiel de prolifération, alors que les Tem produisent des quantités importantes de cytokines mais possèdent un faible potentiel de prolifération. Ces cellules joueraient donc des rôles divers dans les phénomènes de récives de la pathologie (Sallusto, 1999). Elles possèdent également un rôle dans le maintien de la forte fréquence des LTs spécifiques d'haptènes dans le sang (Walzer, 2003).

Les LTs spécifiques d'haptènes, qui sont recrutés dans la peau lors de la phase de révélation de l'EAC, expriment les récepteurs de chimiokines CCR4 et CCR10, l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$, et les molécules de domiciliation cutanée de type CLA (*cutaneous lymphocyte antigen*) (Santamaria-Babí, 2004). Au niveau du site de contact, les LTs vont migrer grâce à des interactions entre les CLA et CCR4 au niveau de leurs ligands respectifs, E et P-sélectine, et suivre le gradient de chimiokines CCL17 exprimées par les cellules endothéliales (Berg, 1991). Le passage des LTs du derme à l'épiderme requière les interactions entre les récepteurs VLA-4 et LFA-1 des LTs et les molécules VCAM-1 et ICAM-1 des cellules endothéliales (Santamaria, 1995). D'autre part, les chimiokines CCL27 exprimées de manière constitutionnelle par les kératinocytes jouent également un rôle dans le phénomène de pénétration des LTs dans l'épiderme (Morales, 1999).

3.5. **Mécanismes mis en jeu lors de la phase de déclenchement**

Lors du second contact d'un individu sensibilisé avec l'haptène impliqué, un EAC se développe. La réaction s'établit en trois temps : (i) - recrutement des LTs CD8⁺ effecteurs *via* l'activation du tissu endothélial par les signaux d'inflammation induits par l'haptène ; (ii) - activation des LTs spécifiques d'haptènes recrutés par la présentation de l'haptène, cela conduit à l'activation des cellules résidentes à travers la production en cascade de médiateurs cytotoxiques et de cytokines / chimiokines ; (iii) - recrutement de leucocytes, préférentiellement des neutrophiles, des macrophages et des LTs induisant les modifications morphologiques et cliniques de l'épiderme caractéristiques de l'EAC.

Le recrutement des LTs effecteurs est orchestré par la sécrétion de chimiokines par les cellules cutanées et les cellules immigrées. Sous les signaux d'inflammation induits par l'haptène et la libération de TNF- α ou IL-1, les LTs sont extravasés du sang *via* la production de sélectines constitutives de type E et P, VCAM-1, ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales. Le passage du derme à l'épiderme est régulé par l'expression de gradients de chimiokines de type CCL2, CCL5, CCL20, CCL22 ou CCL27. La liaison au TCR des LTs recrutés engendrent la sécrétion de cytokines de type 1 comme IFN- γ , TNF- α , IL-4 et IL-17. Sous l'action de ces signaux, les kératinocytes et les mastocytes sécrètent alors de nouvelles chimiokines telles que CXCL10, CXCL11, CXCL9, CXCL8, CCL17 ainsi que diverses cytokines (IL-18, IL-1, IL-6, TNF- α et GM-CSF). Cette cascade de sécrétion de cytokines et de chimiokines est responsable de l'infiltration d'une seconde vague de leucocytes incluant des neutrophiles polynucléaires, des LTs exprimant principalement les récepteurs CXCR3⁺ (récepteurs des chimiokines CXCL10, CXCL11, CXCL9), des monocytes inflammatoires capables de se différencier en macrophages ou en DCs (Albanesi, 2001). Tous ces mécanismes vont alors induire l'inflammation.

3.6. **Mécanismes mis en jeu lors de la phase de régulation**

Le phénomène de régulation peut être divisé en deux phases dites centrale et périphérique. La phase centrale contrôle l'expansion et la différenciation des LTs CD8⁺ dans les ganglions lymphatiques tandis que la phase périphérique limite les processus d'inflammation générés dans la peau (Gorbachev, 2001). Plusieurs mécanismes sont ainsi impliqués, à savoir : (i) - l'élimination des DCs hapténisés par les LTs CD8⁺ effecteurs, (ii) - la liaison des LTs aux ligands régulateurs comme les cadhérines, les PDL-1, les RANK-L... à la surface des DCs, (iii) - la libération de cytokines anti-inflammatoires par les cellules cutanées de type IL-10 et TGF- β (Cavani, 2007). Le rôle de l'IL-10 a été reporté dans l'inhibition de la production de médiateurs pro-inflammatoires comme IFN- γ , IL-1, IL-6, et TNF- α , la modulation de la maturation des DCs et l'inhibition de l'activité des LTs effecteurs (O'Garra,

2004). Cette production d'IL-10 est attribuée aux mastocytes jouant un rôle clé dans le processus de régulation (Grimbaldeston, 2007) ; (iv) - l'activation des LTs régulateurs comme les LTs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, les LTs Tr1, les LTs Th3, les LT Th2 et les cellules NKT (Shevach, 2006 ; Dubois, 2003).

Ainsi, la compréhension des mécanismes de physiopathologie de l'EAC est essentielle pour développer de nouveaux outils de diagnostic ou pour améliorer les techniques actuelles.

4. Diagnostic de l'eczéma allergique de contact aux parfums

Le diagnostic actuel se déroule en deux étapes incluant un interrogatoire et la réalisation de tests épicutanés.

4.1. Interrogatoire clinique

L'interrogatoire a pour but de rechercher une histoire clinique compatible avec le développement de la pathologie. Il vise également à différencier une réaction irritative d'une réaction allergique. Il s'attache à la description précise des symptômes et à leur chronologie. Ainsi le clinicien recherche les produits pouvant être impliqués comme les produits cosmétiques, ménagers, domestiques, professionnels, médicamenteux... utilisés au moment de la réaction par voie directe, à distance, manuportée, par procuration ou aéroportée. Il s'intéresse également aux antécédents atopiques et allergiques familiaux et personnels. La localisation de l'EAC est également un élément important quant à l'orientation vers le produit incriminé dans la survenue de la pathologie.

Cependant, l'interrogatoire, aussi minutieux soit-il, ne permet que très rarement de porter le diagnostic formel de l'EAC. Ainsi, il est complété par l'utilisation de tests épicutanés.

4.2. Les tests cutanés

4.2.1. Les tests épicutanés ou méthodes patch-tests

Les tests épicutanés sont la deuxième étape du diagnostic. Ils ont été expérimentés pour la première fois, il y a une centaine d'année par Jadassohn (La Chapelle, 1996). Ils fonctionnent sur le principe d'une exposition maîtrisée à des allergènes de batterie standardisée. A l'heure actuelle, l'*International Contact Dermatitis Research Group* (ICDRG) a élaboré trois batteries standards majeures qui sont la batterie européenne, la batterie nord-américaine et la batterie japonaise développées en fonction des particularités de chaque continent. En Europe, l'*EECDRG* (*European Environmental and Contact Dermatitis Research Group*) définit pour les pays européens, le contenu de la batterie standard

européenne (BSE). Périodiquement, elle est réactualisée afin de retirer des allergènes obsolètes ou d'introduire des allergènes émergents. Les allergènes inclus présentent une fréquence supérieure ou égale à 1 % chez des patients testés consécutivement pour une suspicion d'EAC et doivent avoir un minimum d'effets secondaires lors de la réalisation des tests. De plus, les allergènes de la BSE doivent être des molécules communément retrouvées dans l'environnement des patients et avoir une pertinence clinique. Ils doivent également ne pas induire un nombre trop élevé de tests faussement positifs. Dans ces protocoles, les allergènes sont le plus souvent dispersés dans la vaseline blanche, afin de rendre reproductible les volumes appliqués sur la peau du patient ; dans certains cas, ils sont dilués dans un solvant organique ou en phase aqueuse (Mathelier-Fusade, 2009 ; Raison-Peyron, 2009).

Les patch-tests ou les tests épicutanés visent à reproduire la réaction décrite par le patient suspect d'une allergie à une substance donnée... (Mathelier-Fusade, 2009). Ils sont le plus souvent réalisés sur le dos du patient, sous occlusion. Avant l'application, la peau est systématiquement nettoyée par application d'un antiseptique. Simultanément, plusieurs allergènes sont criblés, en priorité à titre d'orientation (la BSE regroupant 27 allergènes) puis des batteries standards spécialisées comme pour les parfums. Sont également testés des produits apportés par le patient, testés tels quels si leur forme galénique le permet (lotion, crème...). Il existe plusieurs systèmes occlusifs, le plus répandu est celui des Finn Chamber®. Il s'agit de petites cases en aluminium de 8 mm² avec un volume de 15 µL pourvues d'un disque de papier filtre. Les solutions d'allergènes ou les dispersions sont directement appliqués sur ce filtre, le solvant s'évapore alors. Leur avantage réside dans le fait qu'un grand nombre d'allergènes peut être criblé simultanément. Une technique alternative est le True Test® (*Thin layer Rapid Use Epicutaneous Test*) qui se présente sous forme d'une bande de tests standards préalablement déposés sur un papier absorbant. Elle permet une meilleure répétabilité des doses appliquées et un emploi facile.

Ils sont retirés à 48h et les lectures s'effectuent 48h et 72h ou 96h (2 lectures) après la dépose des produits. Les résultats sont appréciés selon la classification de l'ICDRG (Krasteva, 1999):

0 ou -	Négatif : absence de réaction
+/- ou ?	Douteux : érythème simple
+	Positif faible : érythème et œdème
++	Positif fort : érythème, œdème et vésicules bien visibles
+++	Positif violent : érythème, œdème et vésicules coalescentes ou bulles
IR	Irritation : œdème absent, aspect fripé, papules, pustules, hypopion, nécrose
NT	Non testé : pour indiquer un allergène manquant.

4.2.2. Les tests semi-ouverts

Ces dispositifs sont utilisés pour les produits allergisants doués également de pouvoir irritant comme les mascaras, les shampoings, les laques... Les produits sont déposés à l'aide d'un coton-tige sur une surface de peau d'environ 1 cm². Après évaporation, la zone est recouverte d'un adhésif acrylique et la lecture est semblable aux tests épicutanés.

4.2.3. Les tests ouverts ou open tests

Classiquement, cette méthode est utilisée pour les produits inconnus incriminés par le patient ou en cas de suspicion d'une réaction immédiate, notamment pour les substances parfumées. La substance potentiellement allergisante est déposée sur l'avant-bras du patient, la zone n'est pas recouverte d'un pansement occlusif. La lecture est réalisée dans les mêmes conditions que pour les deux tests précédents.

4.2.4. Les tests ouverts à application répétée (ROAT tests)

Dans certains cas, les tests épicutanés peuvent s'avérer négatifs malgré une forte suspicion clinique. La peau du dos n'est pas toujours représentative de localisations telles que les paupières, le cou ou les aisselles, zones de développement de la pathologie en cas d'EAC aux parfums (dans ces zones la peau présente une épaisseur plus faible). Les tests ouverts à application répétée sont alors mis en œuvre. Ils consistent à faire appliquer dans le pli du coude ou sur la face antérieure de l'avant-bras l'agent parfumé suspect, matin et soir, pendant sept à dix jours, temps nécessaire pour déclencher la réaction initiale. Cette période de déclenchement peut, en fonction des individus, varier, dépendant du degré de sensibilisation et de la concentration de l'allergène au moment de l'exposition (Andersen, 2001).

4.2.5. Les tests de réintroduction réalistes ou tests d'usage

Ils sont utilisés lorsque le produit incriminé dans le développement de la pathologie a été identifié par le patient. Ils consistent à réappliquer sur la zone du tégument, initialement atteinte, le produit après 10 à 15 jours d'arrêt et la constatation d'une amélioration clinique. Cette application doit s'effectuer dans les conditions tout à fait analogues à celle de la vie courante.

4.2.6. Les limites de l'exploration des allergies

Ces tests présentent un intérêt certain dans le diagnostic de la pathologie mais se heurtent néanmoins quelques écueils. En effet, un test positif indique que le patient présente une sensibilisation à l'égard de la molécule appliquée, mais ne prouve en aucun cas que ce produit provoque une allergie.

La sensibilité et la spécificité actuelles des tests épicutanés est de l'ordre de 70 % (Nethercott, 1990 ; Nethercott, 1995). Un test négatif n'exclut donc pas complètement la possibilité d'une sensibilisation aux produits testés. La négativité peut être due au fait que l'ingrédient responsable a été testé à de trop faibles concentrations. De plus, les lectures sont peu spécifiques. En effet, il est parfois difficile d'exclure les faux positifs qui peuvent être dus à des réactions d'irritation, ou au débordement de réactions voisines très positives. Dans certain cas, l'allergène, n'a pas été testé dans un véhicule adapté et l'association moléculaire a engendré l'allergie ou au contraire l'en a empêché. D'autre part, ils peuvent présenter des effets secondaires voir des complications dans certains cas.

Les patch-tests peuvent engendrer également d'autres complications. Des cas d'anaphylaxie ont été observés avec certains antibiotiques comme la pénicilline, la bacitracine ou la néomycine. Dans certains cas, la positivité du patch-test peut induire une généralisation de la pathologie, appelée réaction syndromique. Une sensibilisation active peut être asymptomatique ou se traduire par une réaction non prurigineuse apparaissant dans un délai de 9 à 21 jours qui peut persister plusieurs semaines, communément appelé « flare up ». Un nouveau patch-test avec le même allergène quelques semaines plus tard donnera lieu à une réaction positive en 2 ou 3 jours. Enfin les patch-tests peuvent laisser au patient des séquelles irréversibles telles que des troubles de la pigmentation au niveau de la zone de dépôt ou des cicatrices en cas de tests positifs violents, bulleux, caustiques. (Castelain, 2009).

De plus, dans le cas du diagnostic de l'EAC aux parfums, de nombreux cas d'allergie composée sont dénombrés. Les tests pratiqués avec les composants isolés du fragrance mix I, par exemple, ne sont pas toujours positifs chez un patient allergique au mélange. L'allergie résulte alors de la formation d'une nouvelle substance allergisante dans le produit ou d'une interaction entre plusieurs substances dans le métabolisme cutané (Goossens, 2002).

Par ailleurs, les allergènes odorants de la BSE sont considérés comme des prohaptènes ou des préhaptènes et il est ainsi possible d'observer des réactions d'allergie croisée. Un patient sensibilisé au cinnamaldéhyde pourra dans certain cas réagir avec l'alcool cinnamique, ces deux haptènes conduisant à l'activation des mêmes clones de LTs spécifiques.

4.3. Développement de tests immunobiologiques

Il a été montré précédemment que les LTs jouent un rôle central dans l'EAC. Ainsi, la fréquence de LTs spécifiques de l'haptène dans le sang est estimée entre 1 / 250 à 1 / 10 000 de LTs, avec une persistance à long terme de ces cellules dans le sang circulant (Andersen, 2001; Kalish, 1994). Partant de ce constat, il a été envisagé de développer des tests immunobiologiques qui ont pour but de rechercher la présence de LTs spécifiques d'allergènes de contact dans la peau et / ou le sang des patients permettant le diagnostic de l'EAC chez un patient. Au niveau du sang, la détection peut se faire par un ensemble de méthodes possibles utilisant la radioactivité (tests de transformation lymphocytaire), la cytométrie de flux, ou encore les techniques moléculaires (répertoire des LTs).

4.3.1. Etude de l'activation lymphocytaire pour le développement d'un test immunobiologique

L'activation lymphocytaire conduit à de nombreuses modifications membranaires et intracellulaires. Suite à l'activation du TCR par le complexe majeur du CMH-peptide, le LT rentre dans un processus de maturation impliquant en parallèle des phénomènes de prolifération et de différenciation fonctionnelle. Dans un premier temps, des augmentations du Ca^{2+} intracellulaire et la synthèse d'inositol triphosphate sont observées qui s'accompagnent dans un second temps, de la transcription de gènes d'activation précoce, type c-fos, c-myc, c-jun, NFAT, NF- κ B. Une heure après ces signaux activateurs, est enregistrée la transcription de gènes codant pour l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IFN- γ , le TGF- β ou les marqueurs CD25 et CD40L ainsi que CD69. Ainsi, un à deux jours après le contact, les cellules entrent alors en phase active de prolifération. Enfin, trois à cinq jours après le contact, les cellules se différencient en cellules productrices de médiateurs inflammatoires. Chacune des étapes de ce cycle peut se placer comme des outils de diagnostic potentiel pour détecter les cellules spécifiques des haptènes étudiés.

A cette fin, plusieurs approches ont été proposées afin de mettre en évidence la présence de LTs spécifiques dans le sang des patients. L'analyse de marqueurs membranaires d'activation cellulaire, la mesure de la sécrétion de cytokines après ré-stimulation *in vitro* et la mesure de la prolifération cellulaire, se placent parmi les principales techniques envisagées.

4.3.1.1. Analyse des marqueurs membranaires d'activation cellulaire par cytométrie en flux

Posadas *et al.* ont montré dans le sang de patients en phase aiguë, que l'activation des LTs spécifiques corrèlent avec une surexpression de marqueurs membranaires tel que CD69 (Posadas, 2002). De plus, Mauri-Hellweg *et al.* étudiant des systèmes de ré-stimulation *in vitro*, ont mis en évidence la présence de marqueurs membranaires tels que CD25, CD69, CD40L et plus tardivement CD71 et HLA-DR (Mauri-Hellweg, 1995; Lerch, 2007). La surexpression du CD69 sur la population des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ a été observée en cytométrie en flux 36 h après la co-culture *in vitro* allergène – PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) pour deux patients possédant une hypersensibilités aux produits de contraste iodés par Lerch (Lerch, 2007). Néanmoins, aucune donnée portant sur la spécificité et la sensibilité de cette méthode n'est actuellement disponible.

4.3.1.2. Analyse des cytokines produites après ré-stimulation *in vitro*

Lors de la ré-stimulation *in vitro* des PBMCs avec un antigène, l'activation des cellules engendre la sécrétion d'un large panel de cytokines. L'IFN- γ reste la cytokine la plus étudiée et se place donc comme une cible potentielle dans le développement de tests immunobiologiques (Rozieres, 2009).

Beeler *et al.* se sont intéressés au profil cytokinique sécrété lors de la réactivation de LTs *in vitro* par des médicaments, en étudiant l'IFN- γ , l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. Ils montrent ainsi sur 5 patients l'intérêt du dosage de cytokines par ELISPOT, et plus particulièrement de l'étude de l'IFN- γ , les autres cytokines étant faiblement sécrétées (Beeler, 2006). En outre, l'IFN- γ est particulièrement utilisé en raison de la restriction de production de la cytokine IFN- γ à la population des LTs. Les techniques d'analyses utilisées doivent présenter une forte sensibilité ; ainsi les techniques ELISPOT et multiplex sont les méthodes les plus adaptées (Gazagne, 2003 ; Malkusch, 2005). De plus, ces deux techniques peuvent être facilement transférées des laboratoires de recherche aux laboratoires de biologie de routine. Cette technologie permet donc le diagnostic d'allergie aux médicaments chez des patients qui ont développé des toxidermies bénignes ou sévères et qui ont des LTs circulants spécifiques de médicaments. Les allergènes de contact étant, comme les médicaments, des haptènes, il apparaît tout à fait possible de pouvoir développer un test immunobiologique de l'EAC.

4.3.1.3. Test de transformation lymphocytaires

Le Test de Transformation lymphocytaires (TTL) est le test le plus souvent décrit pour la détection d'une sensibilisation à un antigène. Il consiste à mesurer la prolifération des PBMCs induite par la ré-stimulation *in vitro* de l'antigène après 5 à 6 jours (Nyfeler, 1997 ; Pichler, 2004). La prolifération est mesurée par incorporation d'un marqueur radioactif, la thymidine tritiée. Les résultats sont le plus souvent exprimés par un index de stimulation, rapport entre la prolifération obtenue en présence de l'antigène sur la prolifération basale sans l'antigène. Le seuil de positivité varie en fonction des molécules étudiées et la sensibilité fluctue entre 60 et 70 %.

Ainsi, la connaissance de la physiopathologie de l'EAC a permis de sélectionner plusieurs candidats possibles pour le développement de tests immunobiologiques de diagnostic de l'EAC. Il est alors possible d'analyser la prolifération et la polarisation de LTs spécifiques d'haptènes au niveau du sang.

À titre d'exemple, le test utilisé par Summer *et al.* étudiant l'allergie au Nickel chez des patients ayant subi une arthroplastie, porte sur la réalisation de LTT combinée à l'analyse de la polarisation des LTs spécifiques par RT-PCR de type Th1 (IFN- γ , IL-2), Th2 (IL-4) et Th17 (IL-17). Ils ont montré que chez des patients non sensibilisés (patch-test au Ni négatif), une faible prolifération était obtenue (SI = $3,44 \pm 1,15$ pour NiSO₄ 10⁻⁴ M) et aucune sécrétion de cytokines n'a été mesurée. Chez des patients sensibilisés (présentant un patch-test positif aux Ni), les résultats du LTT sont positifs (SI = $12,62 \pm 1,79$ pour NiSO₄ 10⁻⁴ M) et s'accompagnent d'une expression IFN- γ , IL-2, IL-4 et IL-17. Chez des patients sensibilisés au Ni qui subissent des complications après l'arthroplastie, le LTT est positif avec une forte expression d'IL-17 (Summer, 2010). Kneilling *et al.* ont développé un test *in vitro* basé sur le LTT chez des patients sensibilisés à la *para*-phénylenediamine (pPD), présente dans les colorations capillaires. Ils ont montré que la sensibilité de ce test était améliorée lors de la co-culture leucocytes-antigènes en présence d'IL-2 chez l'ensemble des patients présentant une réaction sévère à la pPD sans IL-2, la sensibilité du test étant alors de 62.5% (Kneilling, 2009). Coulter *et al.* ont montré que les patients développant un EAC présentent des facteurs de prédisposition. De plus, les leucocytes de patients sensibilisés à la pPD mis en présence de pPD, prolifèrent et sécrètent de l'IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFN- γ , TNF- α , MIP-1 α/β , MCP-1 et des RANTES contrairement aux patients tolérants à la pPD et sécrétant des taux de cytokines de type Th2 significativement plus faibles. L'analyse des gènes par micro-arrays montrent que la régulation des gènes de la réponse Th2 incluant l'expression d'IL-9, est augmentée chez des patients allergiques contrairement aux patients tolérants. Les LTs CD4⁺ et CD8⁺ purifiés de patients allergiques

prolifèrent en présence de l'allergène et sécrètent des cytokines de type Th2. Chez des patients allergiques aucune prolifération n'est obtenue en présence de pPD et une diminution de 80 % de la sécrétion de cytokine de type Th2 est observée (Coulter, 2009).

Néanmoins, ces tests présentent encore une faible sensibilité et ne peuvent être appliqués au criblage de l'ensemble des haptènes contenus dans les batteries standards. En effet, la majorité des allergènes sont des molécules hydrophobes ne pouvant être solubilisées dans les milieux de culture hydrophiles. Les parfums appartiennent notamment à cette catégorie de molécules.

Ainsi, pour pallier à ses inconvénients, les nanoparticules apparaissent comme des outils promoteurs. Leur taille submicronique ($<1\ \mu\text{m}$) leur confère une très grande surface spécifique, et permet de former facilement des suspensions colloïdales. D'autre part, les NPs possèdent de grandes capacités d'internalisation dans les cellules ce qui pourraient permettre d'augmenter la sensibilité des tests immunobiologiques.

5. Conclusion

L'EAC est une maladie inflammatoire cutanée fréquente, survenant après le contact avec un haptène chez un individu préalablement sensibilisé. Il existe de nombreuses sources d'haptènes dans notre environnement quotidien et les parfums représentent la deuxième cause la plus fréquente d'allergie de contact après le nickel.

Le diagnostic d'EAC représente une étape essentielle dans le processus de guérison du patient résidant dans l'identification puis l'éviction de l'allergène incriminé. Actuellement, il repose exclusivement sur la positivité des tests cutanés, malgré leurs lourdeurs et leurs effets secondaires potentiels. Ainsi, il est important de développer des études portant sur le développement d'un test immunobiologique caractérisant les LTs spécifiques d'haptènes au niveau du sang. Ce genre de protocole permettrait ainsi de s'affranchir des effets secondaires, et simplifierait la prise en charge du patient (simple prise de sang). Le principal enjeu dans le développement de test *in vitro* est la solubilisation de l'haptène dans le milieu de culture. En effet, de nombreux allergènes sont des molécules hydrophobes, insolubles dans les milieux hydrophiles et notamment de nombreux allergènes de la parfumerie. Pour pallier à ses inconvénients majeurs, les NPs pourront être utilisées comme agents de solubilisation.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Ce projet est né d'une collaboration entre l'équipe Génie Pharmacotechnique du Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP) et l'équipe d'Immunologie de l'allergie cutanée et vaccination de l'Unité INSERM U1111. Les axes de Recherche de l'équipe Génie Pharmacotechnique s'articulent autour de la formulation de nouveaux systèmes de vectorisation des principes actifs pour des applications pharmaceutiques et cosmétiques. L'équipe INSERM s'attache à mieux comprendre les mécanismes de la physiopathologie des maladies allergiques cutanées. Les applications directes de ses travaux comprennent le développement de nouvelles méthodes de diagnostic ou prédiction de ces maladies, ainsi que de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à (ré)induire la tolérance vis-à-vis des allergènes en cause.

Le but de ce projet de cette thèse s'est inscrit à l'interface des activités de ces deux équipes et a visé au développement de nouveaux systèmes galéniques pour : (i) - étudier la vectorisation simultanée d'une ou de plusieurs molécules chimiques à travers la peau et (ii) - modéliser la distribution des composés de ce mélange modèle à travers les différentes assises cutanées. En parallèle, un second objectif de ce travail de formulation à consister à générer des nanoparticules pour améliorer la solubilisation du mélange dans les milieux de culture conventionnels et permettre ainsi le développement d'un nouveau test de diagnostic *in vitro* de l'allergie induite par les parfums.

La formulation de ces systèmes galéniques s'est articulée autour d'un cahier des charges précis, visant à produire des NPs :

- biocompatibles et biodégradables pour diminuer les risques de toxicité ;
- de natures différentes pour étudier l'influence des propriétés de surface ;
- de taille moyenne et d'indice de polydispersité respectivement inférieurs à 200 nm et à 0.2, pour permettre une filtration stérilisante. De plus, le paramètre de taille est clé pour former des suspensions colloïdales stables présentant une grande surface spécifique et pouvant passer aisément les membranes physiologiques et / ou cellulaires ;
- permettant d'encapsuler un mélange de molécules odorantes hydrophobes de manière homogène (taux d'encapsulation homogène) appelé fragrance mix I (FMI). Le FMI est composé d'aldéhyde cinnamique, d'aldéhyde amylcinnamique, d'alcool cinnamique, d'eugénol, d'isoeugénol, de géraniol, d'hydroxycitronellal et de mousse de chêne. Durant ce projet, la mousse de chêne n'a pas été étudiée pour le développement de toutes les NPs, cet extrait ayant été retiré du marché, nous avons été dans l'incapacité de nous en procurer.

Ces formes nanoparticulaires ont été générées à partir de procédés standards et maîtrisés au LAGEP tels que la nanoprécipitation, l'homogénéisation haute pression, ou encore l'émulsion - sonication. Ces méthodes ont été adaptées / optimisées / comparées afin de répondre aux difficultés technologiques que posent l'encapsulation d'un mélange. Les objectifs étaient de déterminer : (i) - quels sont les procédés les plus adaptés pour la formulation de nanoparticules répondant aux exigences établies ? (ii) - quels sont les principaux paramètres de formulation (vitesse d'agitation, quantités des différents constituants, tensioactifs les plus adaptés ...) influençant l'encapsulation du mélange modèle dans les différentes nanoparticules ?

La vectorisation du FMI à travers la peau a ensuite été étudiée à l'aide d'un modèle *in vitro* standard basé sur l'utilisation de cellules de Franz. Après avoir appliqué les composés d'intérêt à la surface d'un explant de peau de cochon, la distribution des différentes molécules au sein des assises cutanées (*stratum corneum*, épiderme, derme) ainsi que dans le liquide récepteur est alors évaluée. Ici, le FMI a été utilisé ici comme mélange modèle, il n'existe pas d'intérêt thérapeutique particulier à étudier la diffusion d'un mélange de substances odorantes à travers la peau. Cependant, certaines molécules comme l'eugénol et le géraniol sont fréquemment utilisées comme promoteur d'absorption cutanée dans des stratégies de traitement. En outre, plusieurs questions majeures ont été posées à travers ces travaux : (i) - est-ce que les nano-vecteurs permettent de délivrer un mélange de molécules jusqu'aux couches les plus profondes de la peau ? (ii) - comment les propriétés de surface de ces systèmes impactent-elles sur la distribution à travers les différentes assises cutanées ? (iii) - comment les propriétés intrinsèques de la molécule impactent la pénétration cutanée ? est-il possible de visualiser les NPs au sein du tissu cutané ?

Enfin, pour le développement d'un nouveau test *in vitro* de diagnostic de l'allergie induite par les parfums, nous avons capitalisé sur le développement de nanoparticules encapsulant du FMI pour évaluer si : (i) - solubiliser 8 composés dans un milieu de culture usuel est-il possible avec des nano-vecteurs ? (ii) - les NPs permettent-elles une réactivation robuste des lymphocytes T spécifiques circulant dans le sang de patients reconnus pour leur sensibilisation au FMI ? A ce titre, nous avons mis en place une étude clinique pour recruter 2 groupes de patients présentant des résultats de patch-tests au FMI respectivement positifs et négatifs, et évaluer la réactivation des LTs spécifiques circulants dans un test de lympho-prolifération secondaire.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

ARTICLE 1

Article 1. Fragrance mixture encapsulation into poly- ϵ -caprolactone nanoparticles : optimization of the nanoprecipitation process

L'encapsulation d'un mélange de molécules au sein de NPs constitue un enjeu pour développer de nouvelles applications pour les industries alimentaires, cosmétiques et / ou pharmaceutiques. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au FMI. Ce mélange est composé de molécules de nature hydrophobes qui se caractérisent par la présence de groupements réactifs, comme des fonctions cétones, esters insaturés, aldéhydes, pouvant s'oxyder facilement au contact de l'air. Elles présentent une faible solubilité dans les milieux hydrophiles et sont volatiles. De plus, le contrôle de la libération de ces composés représente un challenge pour permettre de prolonger l'activité du parfum dans le temps. La nano-encapsulation représente une stratégie idéale pour (i) - protéger les molécules odorantes de leur environnement extérieur, (i) - augmenter leur solubilité en milieu aqueux et, (iii) - contrôler leur profil de libération.

Les procédés d'encapsulation des parfums utilisent des techniques standards, comme (i) - la nébulisation - séchage basée sur la nébulisation d'une émulsion de type huile dans eau ou une émulsion multiple eau / huile / eau, (ii) - l'inclusion des molécules odorantes au sein de complexes moléculaires de type cyclodextrine, (iii) - la polymérisation interfaciale, (iv) - la coacervation... Néanmoins, aucune étude ne s'est intéressée au comportement de l'ensemble des molécules constituant le parfum ou l'huile essentielle. Seul le taux d'encapsulation de ou des molécules majoritaires n'ont été pris en compte dans ces nombreuses études.

Il existe de nombreux matériaux matriciels disponibles pour l'encapsulation, le choix de ce dernier est propre au secteur d'application. Ciblant une utilisation dans le domaine biomédical, nous nous sommes focalisés sur le poly- ϵ -caprolactone (PCL), polymère biocompatible et biodégradable. La suspension colloïdale formulée devait répondre aux exigences du domaine, à savoir présenter une taille moyenne et un indice de polydispersité respectivement inférieur à 200 nm et à 0,2 pour permettre une stérilisation par filtration. À cette fin, nous avons sélectionné un procédé de nanoprecipitation également méthode par « déplacement de solvant » se présentant comme une technique simple, reproductible et adaptée à l'encapsulation de molécules hydrophobes au sein de polymères préformés. Il consiste à faire précipiter un polymère hydrophobe, préalablement dissout dans une phase organique (miscible à l'eau), dans un milieu aqueux contenant un agent tensio-actif. Les NPs sont formées instantanément par la diffusion rapide du solvant de la phase organique dans la phase externe.

Les objectifs de ce travail se sont articulés autour de la détermination (i) - de la relation entre les propriétés intrinsèques de chaque molécule ou extrait (constituant le fragrance mix I) et les propriétés physico-chimiques des particules générées, (ii) - de l'impact des paramètres de formulation sur propriétés physico-chimiques des particules générées en s'intéressant particulièrement à (i) - la quantité des différents constituants, au ratio phase aqueuse / organique, (ii) - la masse molaire du polymère utilisé et, (iv) - la composition de la phase aqueuse.

Cette étude nous a permis d'obtenir des particules encapsulant le mélange de parfums répondant au cahier des charges fixé. De plus, nous avons pu corréler l'efficacité d'encapsulation des molécules encapsulées individuellement avec leur coefficient de partage. Lorsqu'elles sont encapsulées simultanément sous forme de mélange, elles adoptent un comportement différent et ces deux paramètres ne sont plus corrélés. Le mélange des 8 composants semble se comporter comme une seule molécule possédant un coefficient de partage intermédiaire. En outre, la taille moyenne, l'indice de polydispersité et la charge de la particule sont très faiblement influencés par la nature des molécules encapsulées et par la façon d'encapsuler les molécules de manière individuelle ou sous forme de mélange.

Dans cette étude, nous avons montré que trois paramètres de formulation permettent d'optimiser le taux d'encapsulation : la quantité d'actif ou de mélange d'actifs, la quantité de tensioactif (polysorbate 80) et le ratio entre les volumes de phase aqueuse et de phase organique. Un rapport optimal de 1 a permis d'obtenir un taux d'encapsulation de 80 % pour l'eugénol seul et de 70 % pour le mélange. De plus, les nanoparticules formulées ont montré une stabilité chimique et physique satisfaisante d'au moins 60 jours à 25 °C et 90 jours à 4 °C sans libération d'actif au cours du temps.

Fragrance mixture encapsulation into poly- ϵ -caprolactone nanoparticles: optimization of the nanoprecipitation process

(Submitted in Journal of Microencapsulation)

A Cortial^{1,2}, M Vocanson², M Bourdon¹, G Agusti¹, and S Briançon¹

¹Université de Lyon, F-69622, Lyon, France, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, France

²Université de Lyon, F-69622, Lyon, France, Université Lyon 1, ENS Lyon, INSERM U1111 – CNRS UMR5308, Centre de Recherche en Infectiologie, France

Stephanie.briancon@univ-lyon1.fr

Abstract

In this work, the nanoprecipitation process was studied to prepare poly- ϵ -caprolactone nanoparticles loaded with Fragrance Mix I (FMI), a mix of eight perfumes frequently used in cosmetic products. The encapsulation of each molecule was first studied and a direct correlation between the encapsulation efficiency (EE%) and the partition coefficient (log P) of fragrance was established. Three parameters significantly influenced EE%: the fragrance amount, the aqueous to organic phase volume ratio, and the surfactant amount. FMI global EE% was close to 70%. Individual EE% of each molecule was modified when encapsulated as a mix instead of as a single molecule and the correlation with log P previously determined did not apply anymore. NP suspensions were stable during 2 months at room temperature and at least 3 months at 4°C, with no fragrance release. These PCL-NPs represent new powerful vectors to protect a fragrance mix from external environment and/or to provide its sustained release.

Keywords

poly- ϵ -caprolactone, nanoparticles, fragrance mix, nanoprecipitation, mix encapsulation.

Introduction

Nanotechnology has been largely expanding within the last thirty years. Interest in nanoparticles (NPs) is essentially based on their inherent morphology and size properties, which confer specific characteristics. Indeed, reducing size to achieve a structure within nanoscale range (1 to 1000 nm) endowed NPs with new properties that are not found in structures with a more conventional size such as a higher surface area and unique physical features (shape, surface charge). Nanoparticles can have many potential applications in medicine for treatment and diagnosis (Sanna, 2014; Zhang, 2008; Doane and Burda, 2012). Furthermore, NPs are also employed for flavor encapsulation to entrap these volatile compounds, to improve the fragrance release and to avoid fragrance degradation. Furthermore, many fragrance molecules have reactive groups in their chemical structure (ketones, aldehydes) that may generate instabilities. Chemical degradation can change their sensory properties and in many cases these metabolites are allergenic products (Matura, 2005; Matura, 2006). Fragrance NPs are found in cosmetic and textile industry for release control, in food industry because they can mask an unpleasant taste or improve flavor performances (Wanichwecharungruang, 2010). Fragrance encapsulation can be achieved by many technologies including: spray drying of double emulsion (Edris and Bergnsthål, 2001), inclusion in molecular complex (Wang and Chen, 2005), incorporation in solid lipid particles by high-pressure homogenization technique (Lai, 2006), or in polymeric particles obtained by interfacial polymerization (Ouall and Lahoussine, 2006; Rodrigues, 2008; Scarfato, 2007) or by coacervation (Martins, 2009). Biodegradable and biocompatible polymeric NPs

are the most common encapsulation systems based on polymers such as poly- ϵ -caprolactone (PCL) or poly lacticco-glycolic acid. These two polymers are widely used due to their favorable toxicological profile. Their degradation kinetics in aqueous buffered media was studied by several teams, which showed a slower degradation of PCL compared to PLGA. Chermenko *et al.* (2009) studied the internalization and degradation of PCL and PLGA NPs in HelaCells by Label-Free Raman Spectral Imaging. They showed, in accordance with previously published data, that PCL degradation patterns were much slower than PLGA ones. Moreover, PCL is degraded by hydrolysis and it was proved non-toxic for human umbilical vein endothelial cells (viability is higher 80% after incubation at 37°C during 24h) at concentrations lower than 1000 mg/mL (Nanaki, 2011).

In this study, PCL-NPs were prepared by a nanoprecipitation process, which also called “solvent displacement method”. It consists of precipitating a polymer previously dissolved in an organic phase, into an aqueous medium containing a surfactant. NPs are instantaneously formed by rapid solvent diffusion to the external phase (Fessi,1989). Many hydrophobic molecules were successfully encapsulated with this method (D’Addio, 2011). Typically, in all encapsulation studies, NPs are loaded with a single molecule. In contrast, we chose to encapsulate a mix of odorant molecules, Fragrance Mix I (FMI), in PCL-NPs. These fragrance molecules are found in scented products such as cosmetics products, air fresheners, household cleaning products, toilet paper, drugs and they are used for the diagnosis of allergy to fragrances (Nardelli, 2013). The aim of this study was to evaluate the feasibility of encapsulating a mixture of molecules and the influence of this mix on the NP properties, especially the size distribution and the encapsulation efficiency (EE %). Nanoprecipitation process is largely influenced by the molecule’s lipo or hydrophilic character (Johnstone and Lippard, 2013). Each fragrance component was first loaded individually in PCL-NPs to study the influence of the lipophilicity on the NPs properties, especially the EE%. The lipophilicity was evaluated with ACD/PhysChem software to determine predictive partition coefficient (log P). The influence of the formulation parameters on NPs physicochemical properties (mean size, polydispersity index (PDI), and EE%) was studied to optimize the nanoprecipitation process. Several factors were considered: aqueous to organic volume phase ratio, fragrance and surfactant amount, polymer molecular weight and amount, and salt presence in aqueous phase. Parameters were chosen to obtain NPs with the highest EE% and the lower mean size with a narrow size distribution. NP mean size and PDI respectively inferior to 200 nm and 0.2 were required in order to sterilize the preparations by filtration. Then, optimal conditions were applied to encapsulate simultaneously all the FMI components.

Materials and methods

Materials

FMI is composed of (α)-amyl-cinnamal, cinnamal, cinnamyl alcohol, eugenol, evernia prunastri (oak-moss) extract, geraniol, hydroxycitronellal, and isoeugenol (Figure 1) (Natsch, 2012). Except Oak-moss, the molecules and the three grades of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (Molecular weight = 14 kD, 65 kD, 80 kD) were purchased from Sigma-Aldrich. Evernia prunastri (oak-moss) extract was graciously provided by Parfum Cosmetic World. Polysorbate 80 was purchased from Croda and acetone with HPLC grade from Fisher Scientific.

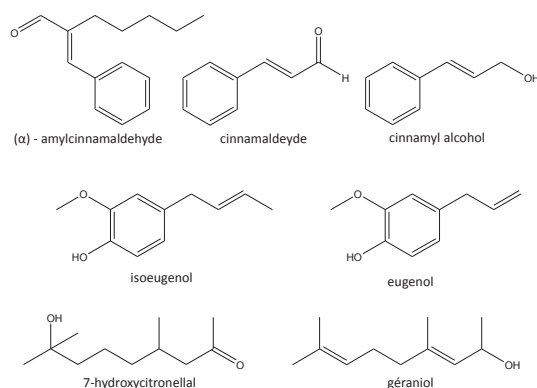


Figure 1. Chemical structure of the fragrance mix I components.

Nanoparticle preparation process

NPs were prepared using a nanoprecipitation process. A standard protocol was first applied to study the influence of the chemical structure of the fragrance molecules. Then the protocol was adapted using eugenol as a model fragrance in order to optimize the NPs properties, i.e. size less than 200 nm, low polydispersity index (PDI < 0.2), and maximum EE%. All the formulation conditions are described in Table 1. Standard protocol is identified as protocol 1.

Table 1. NP preparation protocols

Protocol	Active amount (mg)	PCL molecular weight (kDa)	Polymer amount (mg)	Surfactant amount (mg)	Aqueous/organic phase	Salt adding (0,02 g/mL)
1	200	14 000	25	25	2/1	-
2	100	14 000	25	25	2/1	-
3	300	14 000	25	25	2/1	-
4	400	14 000	25	25	2/1	-
5	200	65 000	25	25	2/1	-
6	200	80 000	25	25	2/1	-
7	200	14000	25	75	3/1	-
8	200	14 000	25	12.5	1/1	-
9	200	14000	25	6.25	0.5/1	-
10	200	14000	25	50	2/1	-
11	200	14000	25	12.5	2/1	-
12	200	14000	50	25	2/1	-
13	200	14000	12.5	25	2/1	-
14	200	14 000	25	25	2/1	Yes

Standard protocol

First, 25 mg of PCL powder was dissolved in 25mL acetone at 40°C (organic phase). After cooling, 200mg (8 mg/mL) of odorant molecules or FMI were added in organic phase. For FMI encapsulation, each compound was added in the same quantity (i.e. 25 mg each to reach a total fragrance quantity of 200mg). Secondly, 25 mg of polysorbate 80 were dissolved in 50 mL of distilled water (aqueous phase). Then, the organic phase was dripped into the aqueous phase under magnetic stirring at 600 rpm. Nanoparticles formed instantaneously by diffusion of acetone in the aqueous phase. Acetone was then removed by evaporation under reduced pressure (100 mbar) at 40°C (Büchi Rotavapor R-124) until a final volume of 50 mL was reached. This method was developed in preliminary experiments, and it was proved that acetone removal did not alter the NPs properties.

Influence of formulation parameters

The influence of several formulation parameters were studied:

- fragrance amount
- aqueous to organic phase volume ratio
- polymer molecular weight
- polymer amount
- surfactant amount
- salt addition in the aqueous phase

Nanoparticles characterization

External morphology by Scanning Electron Microscopy (SEM)

NPs morphology was determined by SEM analysis using a microscope Hitachi, S800 FEG. NPs aqueous suspension was dripped onto carbon adhesive tape. Water was removed at 40°C overnight. Then, samples were coated with 10 nm of platinum in an evaporator by cathodic sputtering. The observation was made with a voltage of 15 kV.

Size distribution and zeta potential

NP size distribution was determined by photon correlation spectroscopy and the zeta potential was evaluated using an interferometric laser called M3 Phase Analysis Light Scattering- (Zeta Sizer Nano ZS, Malvern Instrument) with NP suspension diluted in deionized water (pH comprised between 6 and 7) at 25° C (20 µL of NP suspension were diluted in 2 mL). The analysis model was multimodal narrow modes (high resolution) with a display range between 0.6 and 6000 nm, a lower threshold of 0.05 and an upper threshold of 0.01. Results were the average of 3 measurements per sample and 14 runs per measure. Mean size and polydispersity index were given as results. The zeta potential was calculated by Smoluchowski's equation from the electrophoretic mobility of the nanoparticles.

Fragrance encapsulation

First fragrance recovery was determined by dissolving 50 µL of nanoparticle (NP) suspensions in 1 mL of acetone and quantifying fragrance in this solution by gas chromatography (GC) (total fragrance). The fragrance recovery was calculated by dividing this quantity by the initial quantity introduced in the preparation. In parallel, 1 mL of nanoparticle suspension was centrifuged at 14000 rpm for 30 min to separate the NPs. 500 µL of supernatant was taken off and mixed with 500 µL of acetone. GC assay of this solution gave the non-encapsulated fragrance. The encapsulation efficiency percentage (%EE) and the recovery of fragrance (%recovery) were determined as follows:

$$\%EE = \left[\frac{\text{weight of fragrance} - \text{weight of fragrance non encapsulated}}{\text{initial weight of fragrance in the preparation}} \right] \times 100$$

$$\% \text{ recovery} = \left[\frac{\text{weight of fragrance}}{\text{initial weight of fragrance in the preparation}} \right] \times 100$$

Fragrance quantification was performed by GC with flame ionization detector (GC-FID). Analysis was carried out using Shimadzu instrument GC 2010 plus equipped with split/splitless injector and capillary column Equity-5™ (30 m x 0.25 µm, 0.25 µm film thickness) conditioned at 300°C for 30 min before use. The carrier gas was helium (He) at a constant flow rate of 1 mL/min with a pressure of 100 kPa. The FID detector temperature was maintained at 350°C. The sample volume injected was 2 µL. The injector was set at 220°C, with a split ratio of 50. For eugenol analysis, the oven temperature

was increased from 100°C to 150°C at 5°C/min and the total program time was 15 min. Eugenol retention time (min) was 10.2 min. For the other fragrance analysis, the oven temperature was increased from 100°C to 190°C at 2.5°C/min. The total program time was 35 min. Only one component of *Evernia prunastri* (oak-moss) extract was analyzed. Fragrance retention times (min) and quantification limits are given in Table 2, with the parameters of the calibration curve.

Table 2. Fragrance retention times and quantification limits for fragrance mix I components. Slope and intercept of regression line are the average of 3 measurements for each point.

Fragrance name	Retention times (min)	Quantification limits (µg/g in acetone)	Regression line slope
Géraniol	11,4	0,25	462 (±74)
Cinnamaldehyde	12,3	0,28	533 (±81)
7-hydroxycitronellal	12,7	0,28	406(±81)
Cinnamyl alcohol	13,5	0,28	539(±65)
Eugénol	15,6	0,025	439 (±86)
Isoeugénol	19,7	0,024	392 (±74)
(α)-amylcinnamaldéhyde	28,6	0,27	545(±85)
Oakmoss	31,3	5.5	38.8 (±2.8)

Statistical analysis

All samples and experiments were performed in triplicate. Results were expressed as Mean ± Standard Deviation. An unpaired T test was used to compare the influence of various parameters. P-value less than 0.01 was considered significant noted *, P < 0.001 noted ** and P < 0.001 noted ***. Correlation regression was obtained with GraphPad Prism and spearman correlation was used.

Determination of NP stability

The physicochemical stability of NP suspensions containing fragrance mix was determined by measuring pH and EE% as a function of time and storage conditions. The physical stability was evaluated by size distribution and zeta potential measurements. Three storage conditions were assessed: 4°C, 40°C, and room temperature during 3 months under static conditions. NPs were considered stable if no significant difference was observed between the initial values and the measurements after storage.

Results

Influence of the fragrance nature

NPs were prepared using the standard protocol also called protocol 1 (Table 1). Seven flavor molecules were encapsulated to evaluate the influence of the fragrance chemical structure and log P on the NP properties. All preparations were opalescent with whitish color and NPs presented spherical shape (Figure 2). NPs were characterized by their size distribution, their EE%, their pH, and their zeta potential (Table 3). NPs had a mean size varying between 140 to 170 nm and polydispersity index less than 0.1. Zeta potential was comprised between -8.16 mV and -1.76 mV. pH of the NP suspensions were between 4.1 et 5.7. As suspensions were prepared with deionized water (pH=5.6), their pH was near this value. log P of the fragrance molecules ranged between 1.65 and 4.80 and the EE% varied from 5% to 99% (Table 3) according to the molecule. EE% was slightly correlated to the log P ($r_{\text{spearman}}=0.89$ and $P_{\text{val}}=0.0123$ or *) (Figure 3). The total recovery was high ($80.8\% \pm 6.8\%$) and independent of molecules and fragrance EE%.

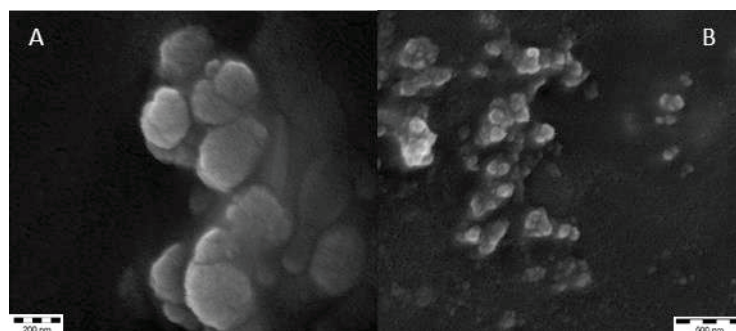


Figure 2. Scanning electron microscopy images of PCL nanoparticles containing eugenol prepared with standard protocol. Scale bar represents (A) 200 nm with 80000X of magnitude and (B) 500 nm with 60000X of magnitude.

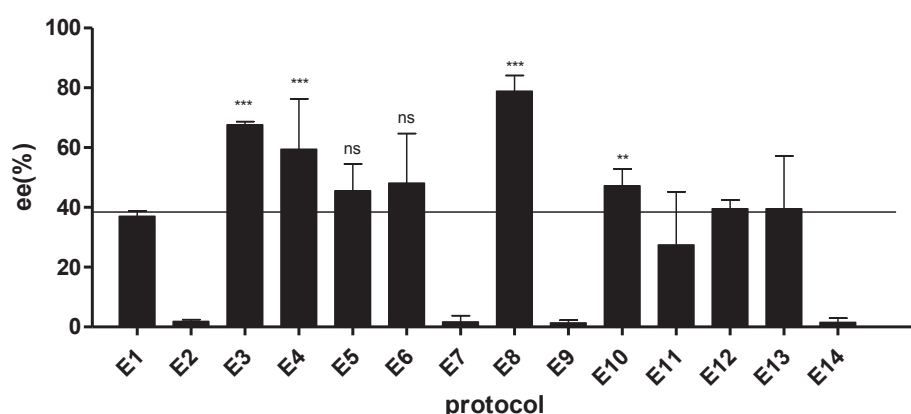


Figure 3. Eugenol EE% as a function of formulation variables. (Protocol conditions are described in Table 1, standard protocol is E1). Results are the average of three measurements on three samples. Statistical analysis: $P < 0.01$ is noted *, $P < 0.001$ is noted ** and $P < 0.001$ noted ***, ns= non significant.

Table 3. Fragrance log P and properties of NPs loaded with fragrances prepared with standard protocol.

Fragrances	Partition coefficient (log P)*	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	pH (25°C)	EE (%)	Recovery (%)
7-Hydroxycitronellal	1.65	151	0.072	-8.16	4.1	5	90
Cinnamyl alcohol	1.70	141	0.094	-1.85	4.4	14	87
Cinnamaldehyde	2.12	137	0.073	-1.76	5.0	88	93
Eugenol	2.20	145	0.092	-2.91	5.7	46	86
Isoeugenol	2.45	141	0.054	-2.22	5.7	59	99
Geraniol	3.28	173	0.092	-1.97	5.6	98	94
α -amylcinnamal	4.80	173	0.092	-7.34	5.7	99	88

*Partition coefficient calculated with ACD/PhysChem software.

Protocol optimization

Eugenol was chosen as the model fragrance to optimize the nanoprecipitation process. The objective was to prepare NPs with the highest EE% and a mean size less than 200 nm. Eugenol NPs properties are summarized in Table 4. E2, E7, E9, and E14 presented a mean size higher than 200 nm due to agglomeration phenomenon. E2, E7, E9, and E14 also presented a very low EE%. These conditions were not suitable for NPs production so they were discarded. Regarding the other preparations, the mean size was evaluated between 170 and 180 nm with PDI less than 0.2. Recovery was close to 80% for all preparations (mean of $80.8\% \pm 6.8\%$). The pH of all NP suspensions was identical, its value corresponding to that of deionized water (pH=5.6). Zeta Potential was slightly negative whatever the formulation. Figure 4 shows the evolution of EE% as a function of the formulation protocol. Three parameters seemed to be essential in this process: active amount (E2, E3, and E4), surfactant amount (E10 and E11) and the aqueous to organic phase ratio (E7, E8 and E9). An increase of surfactant and

active amount slightly increased the EE%. An increase of the aqueous to organic phase ratio resulted in a decrease of EE% and agglomerates were observed in the suspension. On the contrary, if this ratio was decreased, the EE% increased and NPs had a mean size less 200 nm until the aqueous phase volume reached 25 mL. For a lower aqueous phase volume (12.5 mL, E9), the polymer precipitation in the form of NP was not possible and agglomerates were observed. No influence of the polymer amount (E12 and E13) or molecular weight (E5 and E6) was observed. Optimal protocol was E8, prepared with 25 mg of PCL 14 kDa in 25 mL of acetone and 12.5 mg of polysorbate 80 in 25 mL of deionized water, NP suspensions presented a mean size equal to 170.5 nm (± 3.89) with an EE% of 78.9 (± 5.3).

Table 4. Properties of eugenol loaded NPs. (Protocol conditions are described in Table 1, standard protocol is E1).

Formulation	Protocol	Particles size (nm)	PDI	pH (25°C)	Zeta potential (mV)	Reaction Recovery (%)
E1	1	165,8 ($\pm 18,2$)	0,139 ($\pm 0,109$)	5.6	-1.75 (± 0.31)	80.8 (± 3.7)
E2	2	150,2 ($\pm 1,6$)	0,090 ($\pm 0,020$)	5.6	-1.81 (± 0.39)	81.7 (± 4.3)
E3	3	167,7 ($\pm 1,9$)	0,061 ($\pm 0,022$)	5.6	-2.71 (± 0.55)	78.8 (± 4.7)
E4	4	177.9 (± 7.9)	0.076 (± 0.056)	5.6	-2.04 (± 0.46)	77.8(± 3.6)
E5	5	157,1 ($\pm 6,6$)	0,099 ($\pm 0,019$)	5.5	-1.97 (± 0.37)	65.7 (± 4.7)
E6	6	248,7 ($\pm 58,8$)	0,120 ($\pm 0,144$)	5.6	-3.05 (± 0.45)	89.6 (± 2.4)
E7	7	1290.9 (± 722)	0.296(± 0.030)	5.6	-1.05 (± 0.24)	85.4 (± 4.3)
E8	8	170,5 ($\pm 3,89$)	0,098 ($\pm 0,025$)	5.5	-4.25 (± 0.74)	72.3 (± 4.1)
E9	9	1078,9 ($\pm 206,9$)	0,303 ($\pm 0,015$)	5.6	-5.04 (± 0.84)	80.2 (± 1.4)
E10	10	168,7 ($\pm 7,2$)	0,099 ($\pm 0,013$)	5.7	-4.12 (± 1.01)	85.0 (± 3.1)
E11	11	165,6 ($\pm 1,3$)	0,121 ($\pm 0,056$)	5.6	-2.04 (± 0.91)	85.8 (± 5.3)
E12	12	188,1 ($\pm 16,7$)	0,104 ($\pm 0,021$)	5.6	-6.04 (± 0.53)	73.2 (± 3.1)
E13	13	160 ($\pm 25,9$)	0,057 ($\pm 0,018$)	5.6	-6.42 (± 0.25)	87.4 (± 5.2)
E14	14	959,1 ($\pm 423,5$)	0,665 ($\pm 0,194$)	5.6	-3.85 (± 0.12)	88.0 (± 3.2)
AVERAGE						80.8 (± 6.8)

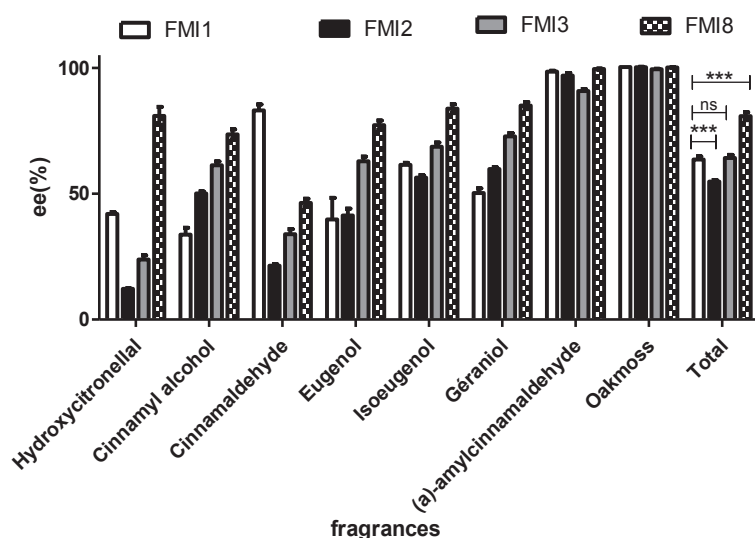


Figure 4. FMI EE%. Each fragrance encapsulation EE% is indicated by bars and total encapsulation is the average of each molecule encapsulation. Colorless square: protocol 1(standard protocol), black square: protocol 2(decrease fragrance amount), grease square: protocol 3(fragrance amount increase) and pointed square: protocol 8 (aqueous to organic volume phase ratio equal to 1). Statistical analysis: P< 0.01 noted *, P<0.001 noted ** and P<0.001 noted ***.

NPs loaded with a mix of fragrances (FMI) development

Considering the previous results with eugenol, three parameters influenced the NP properties: fragrance amount, surfactant amount, and organic to aqueous phase volume ratio. So protocols 1, 2, 3, and 8 were applied to encapsulate the fragrance mix. Each fragrance was introduced at the same

concentration in the organic phase, and the global concentration was 8mg.mL⁻¹ (FMI1 and FMI8); 4 mg.mL⁻¹ (FMI2) and 12 mg.mL⁻¹ (FMI3). Table 5 shows the properties of FMI-NPs. The mean size of these NPs varied between 165 and 185 nm with a constant PDI around 0.09 (corresponding to the fixed criteria). A low increase in the mean size was observed when the aqueous to organic ratio was decreased to 1 (FMI8). However, no significant difference was observed between the mean size of NPs encapsulating single molecules and NPs encapsulating the mix. Fragrance recovery was evaluated between 69% and 84%, these values were slightly lower than values obtained with individual molecule encapsulation. EE% was calculated for each molecule and total fragrance encapsulation was calculated as the average of individual fragrance EE%. This global EE% was used to determine the impact of the formulation parameters. A significant difference was noted between FMI1 and FMI2 (decreasing fragrance amount resulted in a decrease of EE%) and between FMI1 and FMI8 (increasing the ratio of aqueous to organic phase resulted in an increase of the EE%). FMI1 allows comparing individual fragrance EE% and EE% of the same fragrance in the mix. In the mix, EE% varied from 33.7% to 100% (Figure 5). The EE% of molecules with a low log P increased in the mix compared to the EE% of single molecule encapsulation. For example, 7-hydroxycitronellal individual encapsulation resulted in a 5% EE% and this value reached 41.9% when 7- hydroxycitronellal was mixed with the other components. On the contrary, the EE% of molecules with a high log P decreased when encapsulated as a mix instead of a single molecule. For example, geraniol individual encapsulation resulted in a 98% EE% and EE% fell down to 50.3% when geraniol was mixed with the other components. No correlation was calculated between the log P of molecules in the mix and their EE% ($r_{\text{spearman}}=0.6071$ and $P_{\text{value}}=0.1667$ or ns). NPs from FMI8 presented a mean size equal to 183.6 nm (± 12.9 nm) with a total fragrance EE% of 80.8% (± 1.5 %) and a recovery of 69.0% (± 0.2 %). Furthermore, EE% was higher than 46.3% for all molecules. FMI8 was considered as optimal.

Table 5. FMI NP properties (Protocol conditions are described in Table 1).

	FMI1	FMI2	FMI3	FMI8
Protocol	1	2	3	8
Recovery (%)	78.2(± 0.2)	84.3(± 0.2)	79.9(± 0.2)	69.0(± 0.2)
Size(nm)	177,9($\pm 4,1$)	168,4($\pm 0,7$)	168,9($\pm 6,2$)	183,6($\pm 12,9$)
PDI	0,079($\pm 0,008$)	0,098($\pm 0,040$)	0,095($\pm 0,019$)	0,094($\pm 0,019$)
EE%	63.5 (± 2.4)	54.8 (± 1.5)	64.2 (± 2.8)	80.8 (± 1.6)

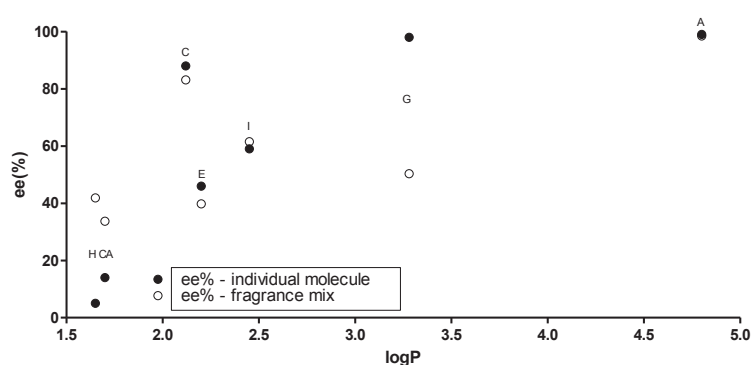


Figure 5. Correlation between EE% and log P of different fragrance molecules noted H: 7-hydroxycitronellal, CA: Cinnamyl alcohol, C: Cinnamaldehyde, E: Eugenol, I: Isoeugenol, G: Géraniol and A: Alpha-amylcinnamaldehyde.

FMI suspension stability

NP suspension stability was achieved by studying the evolution of pH, zeta potential, size, and PDI during storage at 3 temperatures (4°C, 25°C, 40°C), results are shown in Figure 6. The pH of the suspensions remained constant during 1 month whatever the storage conditions. For prolonged

periods, a decrease in pH was observed, except for the suspensions stored at 4°C. The pH decrease was inversely proportional to the storage temperature. This evolution can be attributed to a microbial contamination, as no preservative was added to the suspensions. At 25°C, an insignificant decreasing in pH was observed after 30 days, destabilization occurred after 60 days. The mean size and PDI of all suspensions were constant during 90 days at 4°C and 25°C. At 40°C, after 30 days, mean size and PDI increased gradually due to the formation of aggregates in the suspensions. No zeta potential evolution was observed during storage; it remained slightly negative (-3.1mV). The stability of encapsulation was evaluated at 25°C by measuring the release of fragrances from NPs during 2 months storage. As shown in Figure 6, encapsulation was stable during 2 months for all components except 7-hydroxycitronellal and cinnamaldehyde. A release of 50% was measured for 7-hydroxycitronellal and 6% for cinnamaldehyde after 30 days. However, these molecules had a lower initial encapsulation efficiency and this release had low impact on total fragrance encapsulation.

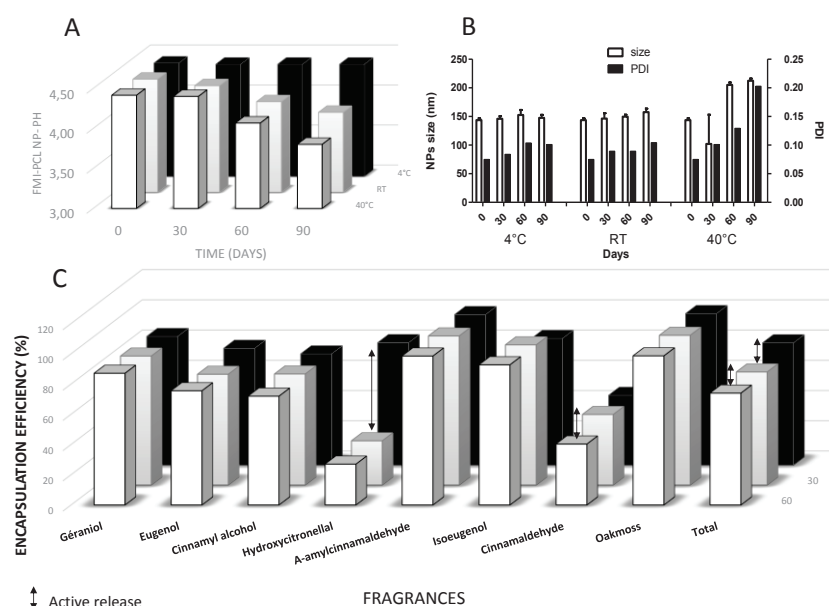


Figure 6. Stability of FMI-NPs suspension prepared with protocol 8 (A): pH evolution (black bar = 4°C, Grey bars = 25°C and White bars= 40°C) (B): mean size (white bars) and polydispersity index (black bars). (C): EE% after 2 months storage at 4°C (black bars), 25°C (grey bars) and 40°C (white bars).

Discussion

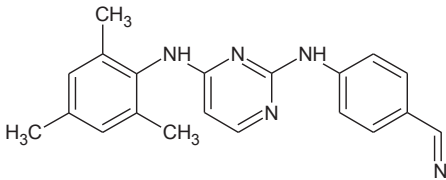
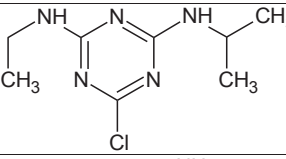
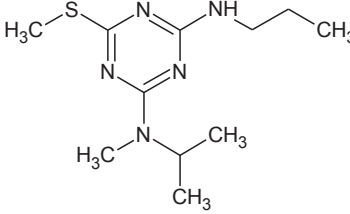
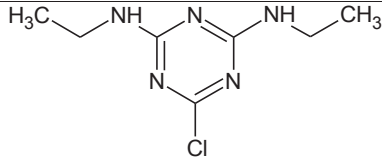
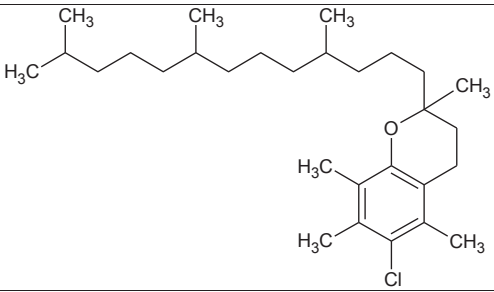
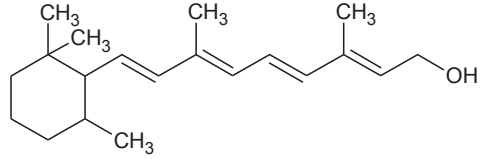
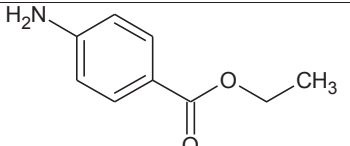
In this study, we chose to prepare biodegradable NPs loaded with a mix of fragrances. These NPs required a mean size below 200 nm and a PDI inferior to 0.2. The nanoprecipitation method was chosen due to its simplicity and highly reproducible character. Furthermore, it enables the production of NPs sized within the 100 – 300 nm range (Morales-Cruz, 2012). PCL attracted our attention with its physicochemical properties adequate for nanoparticle preparation by the solvent displacement method. It possesses a low melting point ($T_m=58.1^\circ\text{C}$), a low glass transition temperature ($T_g=-68.2^\circ\text{C}$), and a good solubility in acetone (Nanaki, 2011). This polyester polymer was also approved by Food and Drug Administration; it is hydrolyzed into nontoxic metabolites in physiological conditions (Almouazen, 2012). Moreover, Lemoine *et al.* (1996) demonstrated that PCL-NPs were more stable than PLGA ones. For these reasons, a PCL polymer was used.

We first determined the properties of PCL-NPs loaded with individual odorant molecules to evaluate a relationship between log P, chemical structure, and EE%. NPs suspensions were in accordance with established criteria and could be sterilized by filtration at 0.2 μm . In the literature, PCL-NPs obtained

by solvent displacement had a similar size and polydispersity index. Almouazen *et al.* (2012) have previously reported similar mean size for PCL-NPs (180nm) loaded with retinol obtained with the same process. Khayata *et al.* (2012a) also prepared vitamin E-loaded nanocapsules with a mean size of 150 nm. Zeta potential of our preparations was negative due to the carboxylic terminal groups of PCL. Kamath *et al.* (2014) and de Araújo *et al.* (2013) obtained respectively resveratrol-loaded albumin nanoparticles entrapped into PCL-NPs with a charge of -28 mV and PCL-NPs loaded with insulin with a charge of -29 mV. In our study, NPs were stabilized with Polysorbate 80, a non-ionic agent coating the NP surface area, which decreased the NP surface charge. In this process, nanoparticles were formed *via* the classical nucleation theory or *via* the Gibbs-Marangoni effect (Mora-Huertas, 2012). In these two cases, surfactant agent only prevents particles agglomeration by adsorption on NP surface. In general, non-charged surfactant decreases the zeta potential value irrespective of pH and salinity (Einarson and Berg, 1993; Trimaille, 2003). As shown by das Neves *et al.* (2013), the surface charge of nanoparticles greatly depends on the surfactant used in the preparation and its adsorption density at the nanoparticle surface. Using classical surfactants, which adsorb at the particle surface resulted in a high negative (with SLS as anionic surfactant) or positive (with CTAC as cationic surfactant) charge. On the contrary, the copolymer poloxamer, due to its low adsorption density did not alter the surface charge of the particles, which remained that of the PCL (de Neves, 2013). In our study, polysorbate 80 was adsorbed at the NP surface and covered the PCL charges. However, this low surface charge did not impair the suspension stability and the size distributions were not modified during at least 90 days at 4°C and 25°C.

A positive correlation between log P and fragrance EE% was established when molecules were encapsulated alone. This correlation did not apply in the case of FMI encapsulation. The results suggested that EE% was mainly determined by the affinity of the fragrances for poly-epsilon-caprolactone. Nii and Ishii. (2005) established a similar relationship between EE% of drugs in liposomes and their log P, EE% increasing with log P. Considering these results, log P seemed to be a good indicator to predict the EE% in poly-epsilon-caprolactone NPs. However, this is not the only parameter and the behavior of molecules should also be related to their chemical structure and the other operating conditions. Considering two molecules with similar log P (i.e. eugenol and cinnamaldehyde) the EE% obtained with the standard protocol was very different (88% for cinnamaldehyde versus 46% for eugenol), whereas the other properties of NPs were similar. Mora-Huertas *et al.* (2011) reported low encapsulation efficiency with hydrophilic molecules. Furthermore, Barichello *et al.* (1999) also showed variable encapsulation efficiencies EE% according to the molecule log P in PLGA-NPs prepared with the nanoprecipitation process. Seven molecules were studied: cyclosporine (log P 3.35), indomethacin (log P 3.11), ketoprofen (log P 2.81) vancomycin (log P -1.44), phenobarbital (log P 1.67), insulin and valproic acid (log P 1.95). They showed that EE% was very high for lipophilic drugs such as cyclosporin and indomethacin and that no problem of drug leakage to the external medium was observed. For valproic acid, a compound sparingly soluble in water, very low encapsulation efficiency was measured. Ketoprofen demonstrated an intermediate EE% value correlated with its intermediate lipophilicity. Vancomycin and phenobarbital, both soluble in water, were poorly encapsulated into NPs. These results are in accordance with our results, even if the molecules are quite different. To increase the EE% of eugenol, operating conditions had to be adjusted and protocol 8 gave the highest EE% with eugenol. Table 6 gathers some results of the literature and the EE% obtained while preparing PCL based NPs by the nanoprecipitation method with several drugs of variable log P. According to these results, there is no correlation between log P and EE% and values as different as 1.4% for Camptothecin encapsulation (log P 1.60) and 87% for atrazine (log P 1.53) were reported. This reinforces the hypothesis that EE% depends on the hydro-lipophilicity but also on the chemical structure and the formulation parameters.

Table 6. EE% of several molecules of variable partition coefficient in NPs-PCL prepared by the nanoprecipitation method. (results are extracted from the literature).

Actives	Partition coefficient (log P)*	Chemical structure	Molecular weight (Da)	Oil used	EE %	Source
Dapivirine	3.98		329.3	-	98	Das Neves J <i>et al.</i> [31]
Atrazine	1.53		215.7	Miglyo 1810	87	Grillo R. <i>et al.</i> [49]
Ametryn	3.09		227.3	Miglyo 1810	86.7	Grillo R. <i>et al.</i> [49]
Simazine	2.28		201.7	Miglyo 1810	97	Grillo R. <i>et al.</i> [49]
Vitamin E	11.90		402.7	-	98	Khayata N. <i>et al.</i> [25]
Retinol	6.84		286.5	Miglyo 1829-	55	Elmouazen E. <i>et al.</i> [23]
Benzocaine	1.95		165.2	Oil phase	87	Morares CM <i>et al.</i> [22]

*Partition coefficient calculated with ACD/PhysChem software.

Eugenol was used to optimize the nanoprecipitation process in order to obtain NP suspensions with the highest EE% possible and a mean size lower than 200 nm. Eugenol has a mean log P (2.20) compared to the other fragrances (comprised between 1.70 and 4.36) and it allowed the achievement of good results with the standard protocol except the EE%, which was quite low (46%). Twelve additional experiments were done varying the amounts of each component and the ratio of aqueous to organic phase (protocol 2 to 13). The last experiment (protocol 14) was carried out in order to study the influence of a decrease of the aqueous solubility of eugenol by salt addition on the EE%. The result

was not as expected because the presence of salt, decrease the aqueous solubility and so improve the EE%, also influenced the polymer precipitation and the mean size and PDI of the obtained particles were very high and did not pass our criteria. Increasing or decreasing the polymer amount (protocol 12 or protocol 13) did not involve any change in the NPs properties, except a very slight increase of the EE% (insignificant). Giannavola *et al.* (2003) showed no significant variations in the EE% of acyclovir by changing the polymer concentration in the medium. The same results were obtained by Beck-Broichsitter *et al.* (2010) who encapsulated β -agonist salbutamol in PLGA NPs, no influence of the polymer amount on the drug loading was observed. Increasing the polymer molecular weight (protocols 5 and 6) could result in an increase of the mean size and higher encapsulation efficiency due to the increase of the organic phase viscosity (Nii and Ishii, 2005). However, in our study the nanoprecipitation process was carried out in diluted conditions and the polymer molecular weight increase had no impact on the organic phase viscosity, which was that of water whatever the polymer molecular weight. NP suspension named E6 presented a higher mean size and PDI compared to E5 and E1, but no impact on the EE% was recorded. Contrarily to our results, Giannavola *et al.* (2003) encapsulated acyclovir ($\log P=1.76$) into poly-D,L-lactic, and observed a decrease of the drug loading and of the NP size while increasing the molecular weight of polymer. This behavior could be caused by an increase of polymer hydrophobicity modifying the affinity between hydrophilic drugs and polymer. In our study, eugenol was hydrophobic active with a different compartment. The impact of the amount of surfactant was determined (protocol 10 and 11). The presence of surfactant was not essential to prepare NPs, surfactant increased the suspension stability but did not affect the mean size. On the other hand, eugenol EE% increased with surfactant concentration according to the results obtained by Lamprecht A *et al.* with PCL –NPs stabilized by sodium cholate (Lamprecht, 2001). However, this increase was lower than that obtained by varying other parameters and the toxicity of surfactants could limit the interest of such preparation with to high surfactant concentration (Xiong, 2011). So surfactant concentration was maintained at 0.5 mg/mL for further experiments. The amount of eugenol (protocols 2, 3, and 4) in the preparation influenced greatly the EE% as already observed by Zili et al (2005) who studied the encapsulation of grisofulvin in PCL-NPs and showed a decrease of EE% when increasing the drug amount. However, in their study, the drug to polymer ratio was low, it varied from 1/20 to 1/10 and the amount of drug encapsulated increased with this ratio, even if the EE% decreased slightly. In our study, the ratio of drug to polymer was comprised between 4/1 and 16/1 and the EE% increased with the eugenol amount. The EE% obtained with protocols 3 (EE%=68%), and 4 (EE%=60%), were 1.7 and 1.5 times higher than that of protocol 1 (EE%=40%). On the contrary, protocol 2 in, which the amount of eugenol was divided by two, resulted in a very low EE% (2%). Pustulka *et al.* (2013) showed that the encapsulation efficiency of hydrophobic molecules closely depended on the ability of the polymeric matrix to entrap drug and the interaction between polymer and drug. This capacity is related to the chemical structure of the polymer and the drug. Finally we observed an influence of the aqueous to organic volume phase ratio on the NPs properties and an optimum ratio of 1/1 (protocol 8) appeared. Compared to the standard protocol, protocol 8 corresponded to a decrease of this ratio and the NPs properties were improved (EE% increased and the mean size remained lower than 200 nm). On the contrary, when this ratio was increased (protocol 7), agglomerates were observed and the EE% was very low. Lalani *et al.* (2013) showed an increase of EE% with the ratio of aqueous to organic phase. They explained this result by a faster solvent diffusion involving a faster polymer precipitation and so a decrease of the drug leakage into the aqueous external phase. Wehrle *et al.* (1995) also observed a relationship between aqueous to organic phase ratio and NP size and EE%. This was explained by the rate of acetone diffusion which was the main parameter influencing the particle size. In our study, the 1/1 ratio resulted in the highest EE% (80%) and an increase of this ratio (protocols 1 and 7) as well as a decrease (protocols 9) did not improve the EE%, which was 0% with protocols 7 and 9. Due to the mean $\log P$ of eugenol, an

increase of the water phase volume (and so the ratio) could promote the diffusion of eugenol towards the external phase and so reduce the encapsulation efficiency. On the contrary, a too low ratio resulted in the formation of aggregates due to a decrease in the solvent diffusion rate as already reported (Lalani, 2013; Wehrle, 1995). This 1/1 ratio probably represented a compromise between solvent diffusion rate and drug diffusion in the external phase. Guhagarkar *et al.* (2009) showed an increase of the NP mean size for an aqueous to organic volume phase ratio of 5 (near 600 nm).

This part of the study with eugenol led us to the conclusion that only two parameters had an influence on EE%: the aqueous to organic phase volume ratio and the active amount. These two parameters were varied to improve the fragrance mix encapsulation. According to our previous results with eugenol and to Zili *et al.* results (2005), protocol 8 gave the best results: a mean particle size consistent with our criteria (183.6 nm) and the highest global EE% (80.8%) even if the recovery was significantly lower than the others. Exploring more deeply the EE% of each molecule in the mix, it appeared that encapsulating a complex mixture led to an alteration of the EE% compared to their individual encapsulation. The correlation of EE% with the log P of the molecules was especially altered. Fragrance mix improved the encapsulation of these molecules with low log P (below 2). On the contrary, the encapsulation efficiency of molecules with high log P decreased.

Sansukcharearnpon *et al.* (2010) evaluated the EE% of six fragrances encapsulated individually (camphor, citronellal, eucalyptol, limonene, menthol, 4-tert-butylcyclohexylacetate) in a polymebend of ethylcellulose, hydroxypropylcellulose and poly(vinyl alcohol) using the solvent displacement with bag dialysis nanoprecipitation method. These aroma molecules are hydrophobic with $\log P \geq 2.13$. The nanoparticles had a mean size less than 450 nm and EE% was higher than 80% for each molecule. More generally the encapsulation efficiency of hydrophobic molecule is known to be high with the nanoprecipitation method (Mora-Huertas, 2012). However, few data are reported in the literature concerning the encapsulation of a mixture of several molecules. Peña *et al.* (2012) prepared vanillin ($\log P=1.19$) microcapsules based on polysulfone by a phase inversion precipitation technique and the EE%, evaluated by the assay of only one molecule considered as a tracer, was 50%. As well as Li *et al.* (2013) determined the properties of chitosan microparticles encapsulating orange oil, produced by emulsion and spray-drying process, global oil EE% was 93.7%, but it was determined on the measurement of only one major component and the encapsulation efficiency of each compounds in the oil was not determined.

FMI8 suspension stability was evaluated by the study of pH, zeta potential, mean size, and PDI as a function of time and storage temperature. And the according to literature, a slight decrease in pH and in the mean size with an increase of PDI was observed. This could be due to the degradation by hydrolysis of the polymer with formation of acid monomers (Ramos Campos, 2013). FMI8 was stable for three months at 4°C, as no variation in size and zeta potential was measured. In fact, NPs were coated by a layer of surfactant and the stabilization was due to steric repulsion (Khayata, 2012b). Cinnamyl alcohol, geraniol, eugenol, isoeugenol, oakmoss release was recorded suggesting a good interaction between fragrances and PCL. 7-hydroxycitronellal and cinnamaldehyde with a log P value respectively equal to 1.65 and 2.12 released from the nanoparticles over time. This could be explained by low interaction with the hydrophobic polymer PCL.

Conclusion

Fragrance encapsulation was studied in order to protect these compounds from degradation and to extend their release in the final products or after application. In this study, PCL-NPs were loaded with a fragrance mix using the nanoprecipitation process.

Firstly, fragrances were encapsulated individually in PCL-NPs. A correlation between the log P of the molecules and the encapsulation efficiency was established. NP suspension presented a size less than 200 nm with a narrow size distribution (polydispersity index less than 0.2) allowing a sterile filtration of the sample.

Secondly, the influence of formulation parameters was evaluated using eugenol as a model molecule. Several factors were studied: polymer amount, polymer molecular weight, active amount, surfactant amount, and aqueous to organic volume phase ratio. Mean size less than 200 nm with a low polydispersity index was obtained for all the preparation conditions except with high molecular weight polymer. EE% depended on the eugenol amount, the surfactant concentration, and the aqueous to organic volume phase ratio. An optimum ratio of 1, allowing an encapsulation efficiency of 80%, was determined.

Thirdly, the encapsulation of a fragrance mix was studied and the same three parameters were adjusted in order to prepare particles with the same criteria of size and EE%. The encapsulation efficiency of each molecule was different when encapsulated in a mix or alone. The mixture of the 8 components behaved as a single molecule of middle log P and its encapsulation efficiency was intermediate between that of molecules with low log P and that of molecules with high log P. Furthermore, as already observed with eugenol, the highest EE% was obtained when the volumic aqueous to organic phase ratio was equal to 1. An optimal protocol was defined and NP suspensions prepared in these conditions presented a chemical and physical stability during at least 60 days at 25°C and 90 days at 4°C and no release of fragrance was observed. These NPs could be used for the fragrance allergy diagnosis or in cosmetic products due to their sustained release properties.

Acknowledgements

We thank the “Centre technologique des microstructures” of Lyon1 University for SEM images.

Declaration of interest

The authors report no conflict of interest. This project was supported by a Research grants from the French research Minister for Angèle Cortial’s PhD thesis.

References

- Almouazen E, Bourgeois S, Boussaïd A, Valot P, Malleval C, Fessi H, Nataf S, Briançon S. Development of a nanoparticle-based system for the delivery of retinoic acid into macrophages. *Int J Pharm*, 2012;430:207-15.
- Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm*, 1999; 25:471-6.
- Beck-Broichsitter M, Gauss J, Gessler T, Seeger W, Kissel T, Schmehl T. Pulmonary targeting with biodegradable salbutamol-loaded nanoparticles. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 2010;23:47-57.
- Chernenko T, Matthäus C, Milane L, Quintero L, Amiji M, Diem M. Label-free Raman spectral imaging of intracellular delivery and degradation of polymeric nanoparticle systems. *ACS Nano*, 2009;3:3552-9.

D'Addio SM, Prud'homme RK. Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011;63:417-26.

das Neves J, Amiji M, Bahia MF, Sarmento B. Assessing the physical-chemical properties and stability of dapivirine-loaded polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*, 2013;456:307-14.

de Araújo TM, Teixeira Z, Barbosa-Sampaio HC, Rezende LF, Boschero AC, Durán N, Höehr NF. Insulin-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles: efficient, sustained and safe insulin delivery system. *J Biomed Nanotechnol*, 2013;9:1098-106.

Doane TL, Burda C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery therapy. *Chem Soc Rev*, 2012;41:2885–2911.

Edris A, Bergnstahl B. Encapsulation of orange oil in a spray dried double emulsion. *Nahrung*, 2001;45:133-7.

Einarson MB, Berg JC. Electrosteric stabilization of colloidal latex dispersions. *J Colloid Interface Sci*, 1993;155:165–72.

Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammourey N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm*, 1989;55:R1–R4.

Giannavola C, Bucolo C, Maltese A, Paolino D, Vandelli MA, Puglisi G, Lee VH, Fresta M. Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded poly-D,L-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability. *Pharm Res*, 2003;20:584-90.

Grillo R, dos Santos NZ, Maruyama CR, Rosa AH, de Lima R, Fraceto LF. Poly(epsilon-caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *J Hazard Mater*, 2012;231-232:1-9.

Guhagarkar SA, Malshe VC, Devarajan PV. Nanoparticles of polyethylene sebacate: a new biodegradable polymer. *AAPS PharmSciTech*, 2009;10:935-42.

Hwang JS, Kim JN, Wee YJ, Yun JS, Jang HG, Kim SH, Ryu HW. Preparation and characterization of melamine–formaldehyde resin microcapsules containing fragrant oil. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2006;11:332–6.

Johnstone TC, Lippard SJ. The effect of ligand lipophilicity on the nanoparticle encapsulation of Pt(IV) prodrugs. *Inorg Chem*, 2013;52:9915-50.

Kamath MS, Ahmed SS, Dhanasekaran M, Santosh SW. Polycaprolactone scaffold engineered for sustained release of resveratrol: therapeutic enhancement in bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine*, 2014;9:183-95.

Khayata N, Abdelwahed W, Chehna MF, Charcosset C, Fessi H. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: from laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *Int J Pharm*, 2012a;423:419-27.

Khayata N, Abdelwahed W, Chehna MF, Charcosset C, Fessi H. Stability study and lyophilization of vitamin E-loaded nanocapsules prepared by membrane contactor. *Int J Pharm*, 2012b;439:254-9.

Lai F, Wissing SA, Müller RH, Fadda AM. *Artemisia arborescens* L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. *AAPS PharmSciTech*, 2006;7:E2.

Lalani J, Rathi M, Lalan M, Misra A. Protein functionalized tramadol-loaded PLGA nanoparticles: preparation, optimization, stability and pharmacodynamic studies. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013;39:854-64.

Lamprecht A, Ubrich N, Yamamoto H, Schäfer U, Takeuchi H, Lehr CM, Maincent P, Kawashima Y. Design of rolipram-loaded nanoparticles: comparison of two preparation methods. *J Control Release*, 2001;71:297-306.

- Lemoine D, Francois C, Kedzierewicz F, Preat V, Hoffman M, Maincent P. Stability study of nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*, 1996;17:2191-7.
- Li Y, Ai L, Yokoyama W, Shoemaker CF, Wei D, Ma J, Zhong F. Properties of chitosan-microencapsulated orange oil prepared by spray-drying and its stability to detergents. *J Agric Food Chem*, 2013;61:3311-9.
- Martins IM, Rodrigues SN, Barreiro F, Rodrigues AE. Microencapsulation of thyme oil by coacervation. *J Microencapsul*, 2009;26:667-75.
- Matura M, Sköld M, Börje A, Andersen KE, Bruze M, Frosch P, Goossens A, Johansen JD, Svedman C, White IR, Karlberg AT. Selected oxidized fragrance terpenes are common contact allergens. *Contact Dermatitis*, 2005;52:320-8.
- Matura M, Sköld M, Börje A, Andersen KE, Bruze M, Frosch P, Goossens A, Johansen JD, Svedman C, White IR, Karlberg AT. Not only oxidized R-(+)- but also S-(-)-limonene is a common cause of contact allergy in dermatitis patients in Europe. *Contact Dermatitis*, 2006;55:274-9.
- Mora-Huertas CE, Couenne F, Fessi H, Elaissari A. Electrokinetic properties of poly-ε-caprolactone-based nanoparticles prepared by nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: a comparative study. *J Nanoparticle Res*, 2012;14:1-15.
- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods critical comparison. *Adv Colloid Interface Sci*, 2011;163:90-122.
- Morales-Cruz M, Flores-Fernández GM, Morales-Cruz M, Orellano EA, Rodriguez-Martinez JA, Ruiz M, Griebenow K. Two-step nanoprecipitation for the production of protein-loaded PLGA nanospheres. *Results Pharma Sci*, 2012;2:79-85.
- Nanaki SG, Pantopoulos K, Bikiaris DN. Synthesis of biocompatible poly(ε-caprolactone)- block-poly(propylene adipate) copolymers appropriate for drug nanoencapsulation in the form of core-shell nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 2011;6:2981-95.
- Nardelli A, Carbonez A, Drieghe J, Goossens A. Results of patch testing with fragrance mix 1, fragrance mix 2, and their ingredients, and Myroxylon pereirae and colophonium, over a 21-year period. *Contact Dermatitis*, 2013;68:307-13.
- Natsch A, Gfeller H, Haupt T, Brunner G. Chemical reactivity and skin sensitization potential for benzaldehydes: can Schiff base formation explain everything? *Chem Res Toxicol*, 2012;25:2203-15.
- Nii T, Ishii F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *Int J Pharm*, 2005;298:198-205.
- Ouall L, Lahoussine D. Process for production nano-capsules containing a fragrance. WO 2006/027664 A2.
- Peña B, Panisello C, Aresté G, Garcia-Valls R, Gumí T. Preparation and characterization of polysulfone microcapsules for perfume release. *Chem Eng*, 2012;179:394-403.
- Pustulka KM, Wohl AR, Lee HS, Michel AR, Han J, Hoyer TR, McCormick AV, Panyam J, Macosko CW. Flash nanoprecipitation: particle structure and stability. *Mol Pharm*, 2013;10(11):4367-77.
- Ramos Campos EV, Silva de Melo NF, Guilherme VA, de Paula E, Rosa AH, de Araújo DR, Fraceto LF. Preparation and characterization of poly(ε-caprolactone) nanospheres containing the local anesthetic lidocaine. *J Pharm Sci*, 2013;102:215-26.
- Rodrigues SN, Fernandes I, Martins IM, Mata VG, Barreiro F, Rodrigues AE. Microencapsulation of limonene for textile application. *Ind Eng Chem Res*, 2008;47:4142-7.
- Sanna V, Pala N, Sechi M. Targeted therapy using nanotechnology : focus on cancer. *Int J Nanomedicine*, 2014;9:467-83.

Sansukcharearnpon A, Wanichwecharungruang S, Leepipatpaiboon N, Kerdcharoen T, Arayachukeat S. High loading fragrance encapsulation based on a polymer-blend: preparation and release behavior. *Int J Pharm*, 2010;391:267-73.

Scarfato P, Avallone E, Lannelli P, De Feo V, Aderno D. Synthesis and characterization of polyurea microcapsules containing essential oils with antigerminative activity. *J Appl Polym Sci*, 2007;105:3568–77.

Trimaille T, Pichot C, Elaissari A, Fessi H, Briancon S, Delair T. Poly(D,L-lactic acid) nanoparticle preparation and colloidal characterization. *Colloid Polym Sci*, 2003;281:1184–90.

Wang CX, Chen SL. Fragrance-release property of β -cyclodextrin inclusion compounds and their application in aromatherapy. *J Ind Text*, 2005;34:157-66.

Wanichwecharungruang S, Leepipatpaiboon N, Kerdcharoen T, Arayachukeat S. High loading fragrance encapsulation based on a polymer-blend: Preparation and release behavior. *Int J Pharm*, 2010;391:267-73.

Wehrle P, Magenheimer B, Benita S. The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution, evaluated by means of factorial design. *Eur J Pharm Biopharm*, 1995;4:19-26.

Xiong S, Zhao X, Heng BC, Ng KW, Loo JS. Cellular uptake of Poly-(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles synthesized through solvent emulsion evaporation and nanoprecipitation method. *Biotechnol J*, 2011;6:501-8.

Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications developments. *Clin Pharmacol Ther*, 2008;83:761–69.

Zili Z, Sfar S, Fessi H. Preparation and characterization of poly-epsilon-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *Int J Pharm*, 2005;294:261-7.

ARTICLES 2 & 3

Article 2. Eugenol loaded solid lipid nanoparticles: comparative processes

Article 3. Hot homogenization process optimization for fragrance encapsulation in solid lipid nanoparticles.

Ce travail porte sur le développement d'un autre type de nanoparticules appelées nanoparticules lipidiques solides (SLNs) dont les composés matriciels sont des lipides. Il s'agit le plus souvent d'acides gras, d'alcools et d'esters gras, de triglycérides, d'huiles végétales ... comme la tripalmitine, l'alcool cétylique, le palmitate de cétyle, le béhénate de glycéryle, le monostéarate de glycéryle, le distéarate de glycérol, la trimyristine, la tristéarine, et l'acide stéarique. Le choix du lipide est fortement lié à leur point de fusion, compris entre 30°C et 100°C. Le développement des SLNs s'appuie sur la formulation d'une nano-émulsion de type huile dans eau à partir du lipide à l'état fondu, stabilisée par des tensioactifs, refroidie pour obtenir des particules solides à température ambiante (procédé de gélification thermique). En général, un couple de tensioactifs non ioniques hydrophile et hydrophobe est utilisé pour une meilleure stabilité et pour diminuer les risques de toxicité associés aux tensioactifs ioniques.

Actuellement, le procédé le plus utilisé pour la préparation des SLNs est l'homogénéisation haute pression (HPH), procédé facile à mettre en œuvre, qui permet d'obtenir des particules de taille contrôlée, inférieure à 200 nm avec un faible indice de polydispersité (PDI). Il est notamment retrouvé dans les industries cosmétique, alimentaire et pharmaceutique. Une méthode alternative est un procédé d'émulsification suivie d'une étape de sonication (ES). Les particules alors générées sont de tailles comprises entre 200 et 400 nm. Ces deux procédés d'homogénéisation évitent l'utilisation de solvants organiques, et permettent ainsi de diminuer la toxicité des nano-objets générés. De plus, il s'agit de méthodes simples, facilement transposables à des échelles industrielles. Au cours de cette étude, nous avons cherché à capitaliser sur le choix du procédé à utiliser afin de générer des SLNs encapsulant un mélange de molécules, et plus particulièrement le FMI et d'analyser le comportement des différentes molécules au sein de la nanoparticule.

Tout d'abord, nous avons choisi de formuler des SLNs à base de vaseline, matériau inerte, fréquemment utilisé pour des applications cutanées (notamment dans les patch-tests) par HPH ou par ES. Afin de répondre à un cahier des charges précis en termes de taille moyenne, de PDI (respectivement inférieurs à 200 nm et 0,2) et de taux d'encapsulation (le plus élevé possible), nous avons déterminé les paramètres de formulation influençant les propriétés physico-chimiques des SLNs pour ces deux procédés. L'étude portant sur l'HPH a ainsi conduit à identifier trois paramètres influençant la taille moyenne des particules et leur distribution, à savoir la concentration en vaseline, la pression d'homogénéisation et le

nombre de cycles d'homogénéisation. Les SLNs de plus faible taille ont été formulées avec 5% de vaseline, 10 cycles d'homogénéisation, et une pression de 900 bars. L'optimisation du procédé d'émulsion – sonication a mis en évidence que la taille moyenne des SLNs est dictée par l'étape de sonication et plus précisément par le temps et la puissance d'application des ultrasons. Cette étape a été validée avec une puissance de 300 W pendant une durée d'1 min.

Pour ces deux procédés, l'étape de pré-émulsion a été optimisée pour générer une dispersion de taille de monomodale. Ces conditions ont été obtenues lors d'une homogénéisation avec un rotor –stator pendant 15 min sous 24 000 rpm.

Afin de comparer l'HPH et l'ES, à partir de ces deux protocoles optimisés, l'eugénol, molécule modèle, a été encapsulé au sein des SLNs de vaseline. Les propriétés physico-chimiques de ces deux types de particules ont été comparées, afin de sélectionner le protocole le plus adapté à l'encapsulation de molécules odorantes. Ainsi, des SLNs significativement plus petites sont obtenues avec l'HPH (128,5 nm de $\pm 5,3$ nm) avec un PDI de 0,186 ($\pm 0,025$) comparé à l'ES générant des particules de 194,6 nm ($\pm 3,2$ nm) avec un PDI de 0,162 ($\pm 0,034$). Un taux d'encapsulation significativement plus élevé a été obtenu avec l'ES (91,6% ($\pm 0,4$)) que pour l'HPH (88,5% ($\pm 0,6$)). Le potentiel Zêta (proche de -30 mV) et le rendement global (96%) sont les mêmes quelle que soit la méthode de préparation. La spectrométrie infra-rouge à transformée de Fourier FTIR a montré que l'eugénol est dispersé dans les SLNs pour ces deux procédés. Les SLNs formulées avec l'ES répondent donc le mieux aux exigences établies, présentant le taux d'encapsulation le plus élevé et une distribution de taille satisfaisante.

L'ES a ainsi été choisie et appliquée à la formulation d'un panel de NPs de structures matricielles différentes composées d'alcool, d'acide et d'esters gras, de chaînes hydrocarbonées, de triglycérides, stabilisées avec des tensioactifs non ioniques. Ces SLNs ont été développées pour encapsuler le FMI. Ainsi, des SLNs à base de candelilla, de beurre de karité, de cire d'abeille, de triglycérides C10 – C18, de palmitate de cétyle et de vaseline ont été formulées, ces lipides étant tous considérés biocompatibles. Les taux d'encapsulation de ces différentes SLNs ont été comparés. Les SLNs à base de vaseline ont présenté le taux d'encapsulation global le plus faible (66,4%), et le palmitate de cétyle s'est montré être le composé matriciel le plus adapté à l'encapsulation de ce mélange avec un taux d'encapsulation de 94,9%. De plus, le taux d'encapsulation a été corrélé au coefficient de partage de la molécule pour l'ensemble des lipides étudiés, hormis pour le palmitate de cétyle. Pour ce dernier lipide, les taux d'encapsulation sont supérieurs à 84% pour les sept

molécules étudiées. En outre, les SLNs générées présentent une stabilité de 1 mois sans libération de parfums à 25°C pour la vaseline, le palmitate de cétyle et la candelilla.

Eugenol loaded solid lipid nanoparticles: a comparative study of two processes

(Accepted for publication in Journal of Colloid Science and Biotechnology)

Cortial A^{1,2a}, Vocanson M^{2b}, Valour J P^{1c}, Urbaniak S^d, Briançon S^{1e*}

¹Université de Lyon, F-69622, Lyon, France, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, France

²Université de Lyon, F-69622, Lyon, France, Université Lyon 1, ENS Lyon, INSERM U1111 – CNRS UMR5308, Centre de Recherche en Infectiologie, France

^aangele.cortial@univ-lyon1.fr

^bmarc.vocanson@inserm.fr

^cvalour@lagep.univ-lyon1.fr

^durbaniak@lagep.univ-lyon1.fr

^estephanie.briancon@univ-lyon1.fr*

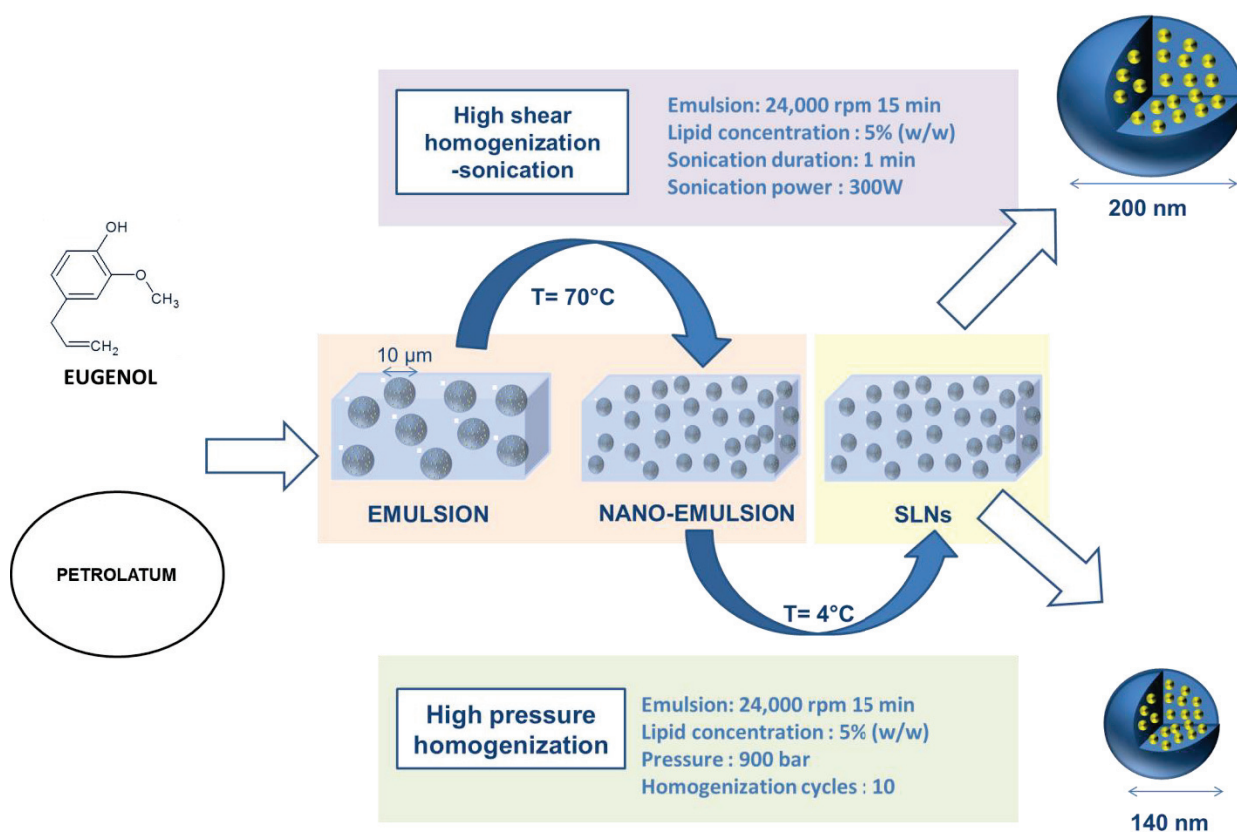
Université Lyon 1, LAGEP -CNRS 5007
43 bd du 11 Novembre 1918
Bâtiment 308G
69622 Villeurbanne Cedex
France
Tel: +33478777110
Fax: +33472431682

ABSTRACT

Petrolatum solid lipid nanoparticles (SLNs) encapsulating eugenol were prepared by two processes. High pressure homogenization (HPH) was compared with high shear homogenization combined with ultra-sonication also called emulsion-sonication process (ES). Both processes were optimized in order to obtain SLNs with a low mean size (diameter below 200 nm) and a narrow size distribution. An experimental design was built to screen the parameters influencing the HPH process. Results showed that the pressure of homogenization, the number of homogenization cycles and the amount of lipids were the most influent parameters. The optimal formulation was obtained with a pressure of 900 bar, 5% (w/w) of lipids and 10 homogenization cycles. SLNs loaded with eugenol obtained by HPH present a lower mean diameter (128.5 ± 5.3 nm) than SLNs prepared with ES process (194.6 ± 3.2 nm). Both SLN suspensions had a narrow size distribution. The total recovery was higher than 95% with both processes. The encapsulation efficiency (EE) was higher with ES (91.6 %) than HPH (88.5 %). This study suggested that ES is a more suitable process for the preparation of eugenol loaded petrolatum nanoparticles with a maximal EE % and a convenient size distribution.

Keywords: solid lipid nanoparticles, eugenol, encapsulation, hot homogenization, high pressure homogenizer, ultrasound process.

GRAPHICAL ABSTRACT



1. Introduction

Eugenol (Figure 1) is a phenylpropene, an allyl chain-substituted guaiacol. This molecule is extracted from cloves, basil, cinnamon and nutmeg [1] and it is widely used in food, pharmaceutical and cosmetic applications due to its antimicrobial and antioxidant properties. Eugenol has applications as flavoring agent in baked foods, beverages, sweets and frozen dairy products, as well as perfume in cosmetic products. In the medical field, antifungal [3], antioxidant [2,4], DNA protective [2] and anti-inflammatory [1,2] activities, as well as local analgesic properties in dental products [2,5] are reported for this phenolic compound. Eugenol is sparingly soluble in water and, as many natural occurring bioactive compounds, it is highly sensitive to oxygen, light and heat [5,6]. Encapsulation in microparticles or nanoparticles is one of the most common strategies to protect compounds from degradation. Furthermore encapsulation improves the dispersion of lipophilic compounds in aqueous media and provides a controlled release of the active compound. In the biomedical field, these particles are made of many carrier materials including natural or synthetic polymers, proteins, lipids or phospholipids [7] ... This study focused on the development of solid lipid nanoparticles (SLNs)

encapsulating eugenol. SLNs offer the same advantages as the other nanoparticles *i.e.* the control of the drug loading, protection and release but they allow to avoid some of their major disadvantages : SLNs are prepared with inexpensive lipids which present a low toxicity compared to synthetic polymers, the use of organic solvent can be completely avoided, SLNs can be easily sterilized...[8, 9].

SLNs are based on lipids which are solid at room temperature. Lipids classically used include fatty acids, triglycerides, vegetable oils and their derivatives [10]. The most commonly cited in the literature are glyceryl tripalmitate [11-13], cetyl alcohol [14], cetyl palmitate [15,16], glyceryl behenate [17,18], glyceryl monostearate [19], glyceryl distearate [20], glyceryl trimyristate [12, 21], glyceryl tristearate [12] and stearic acid [22]. The choice of one lipid depends on the required properties of nanoparticles related to their application, encompassing physicochemical, formulation, pharmacokinetic and cytotoxic aspects [23]. Surfactants are used to decrease the surface tension between lipids and water and to increase the SLNs stability in suspension [24]. The size of SLNs is inversely proportional to the surfactant amount according to Kovacevic *et al.* [25]. Usually, a mix of surfactant is used to improve the stability [26, 27] and non-ionic surfactants are favored due to their limited toxicity [28].

Many production processes are available to prepare SLNs. The most commonly used process is High Pressure Homogenization (HPH); it is easy to handle and scale up and small particles ranging from 120 nm to 200 nm with a narrow size distribution are obtained [29]. Typical lipid contents in the range from 5 % to 10 % are reported for the preparation of submicronic particles. High shear homogenization combined with ultrasounds (ES) [30, 31] is an alternative method for the production of SLNs; it is a simple process and SLNs with size in the nanometer range from 200 to 400 nm are reported [29].

Both processes involve a pre-emulsion step to disperse the melted lipid in coarse droplets in an aqueous phase. It is followed by an homogenization step by HPH or ultrasound technique to reduce the droplet size in the nanometer range. Finally, the nano-emulsion of lipids in water is solidified into SLNs by cooling [29]. In our study, we compared HPH process to ES process. These both processes were adapted to prepare petrolatum SLNs loaded with eugenol with a mean size lower than 200 nm, a narrow size distribution (Polydispersity index (PDI) below 0.2) and the maximal encapsulation

efficiency (EE %), in theory higher than 50 %). The main objective was to select the most suitable process for encapsulating eugenol in petrolatum SLNs.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Petrolatum was purchased from Sigma-Aldrich and eugenol (Figure 1) from PROLABO. Sorbitan monopalmitate (Span 40®) from SEPPIC and polysorbate 40 (Tween 40®) from Fischer Chemical, were used as surfactants.

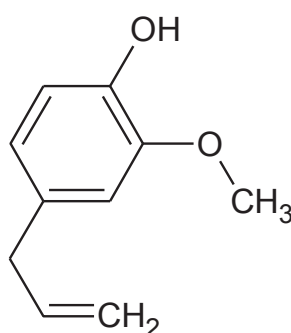


Figure 51. Eugenol chemical representation

2.2. Preparation of SLNs

First, the lipid phase consisting in 5 % (w/w) petrolatum, 0.48 % (w/w) polysorbate 40 and 0.52 % (w/w) sorbitan monopalmitate was heated at 70°C to melt the petrolatum and dissolve the surfactants in this liquid phase. Then, 93.5 % (w/w) of deionized water previously heated at 70°C and 0.5 % of eugenol were added. The mixture was stirred at 24,000 rpm during 15 min using a rotor stator (ultra-turrax T25 Basic with D8 rotor-stator, IKA-Werke). A monodisperse pre-emulsion was achieved (data not shown) which was then submitted to one of the homogenization processes (ultrasounds or HPH).

2.2.1. High shear homogenization combined with ultrasounds (ES)

Ultrasounds were applied in the pre-emulsion to decrease the droplet size by a plane probe of 13 mm diameter (Bioblock scientific vibra cell 75042). The ultrasound power was fixed at 300 W for 1 min. During this step, the mixture was maintained at 70°C and after sonication, the nanoemulsion was cooled down to 0°C without stirring.

2.2.2. High pressure homogenization (HPH)

A lab high pressure homogenizer (Lab Series 1000, APV, SPX Flow Technology Compagny) with a maximal pressure of 1000 bar was used. A multi-factorial experimental design was constructed to determine the influence of the pressure, the duration and the petrolatum concentration on the final particle properties; it was generated with NemrodW software. Three factors were selected: b1 for the number of homogenization cycles, b2 for the homogenization pressure and b3 for the petrolatum concentration. For each factor, a low value (-1) and a high value (+1) were assigned with a central point represented by 0. A screening method was used based on a Hadamard's matrix with two levels and right shift. First, the influence of b1, b2 and b3 was studied through the experimental design 1 described in Table 1. Initial conditions were fixed as the mean values (central point 0), represented by a number of homogenization cycles of 15, a pressure of 600 bar and a petrolatum concentration of 7.5 %. This experiment in the initial conditions was performed four times (numbers 5 to 8) to calculate the variance due to the measurement system and to estimate the experimental error and the standard deviation noted σ . The pressure varied from 300 to 900 bar, the number of homogenization cycles varied from 10 to 20, and the petrolatum concentration from 5 to 10%. The mean particle size and the PDI were the dependent variables. For all the experiments, the ratio of petrolatum to surfactant was maintained at 10 and a batch of 500 mL was prepared. The second experimental design was performed to determine the optimal value of the influent parameters: the number of cycles (b'1) and the amount of petrolatum (b'2). At first, results showing that a decrease of these parameter values improves the particle properties, lower values were investigated (level -1, Table 2). The significance threshold was determined with Student's t test, and it was noted: * when significant at the 95 % level, ** when significant at the 99 % level, *** when significant at the 99.9 % level and ns when non-significant.

Table 1. Experimental design 1: screening of the process parameters: homogenization pressure, number of homogenization cycles and petrolatum concentration. Initial conditions (central point): experiments from 5 to 8.

Test number	Homogenization cycles	Pressure (bar)	Petrolatum concentration (w/w)	Mean size (nm)	PDI (-)
1	20 (+1)	900 (+1)	5% (-1)	144.7	0.113
2	10 (-1)	900 (+1)	10% (+1)	195.6	0.274
3	20 (+1)	300 (-1)	10% (+1)	239.5	0.312
4	10 (-1)	300 (-1)	5% (-1)	185.5	0.153
5	15 (0)	600 (0)	7.5% (0)	142.1	0.205
6	15 (0)	600 (0)	7.5% (0)	172.6	0.185
7	15 (0)	600 (0)	7.5% (0)	161.4	0.153
8	15(0)	600 (0)	7.5% (0)	180.1	0.220

Table 2. Experimental design 2: influence of the decrease of the number of homogenization cycles (-1) and the petrolatum amount (-1). Initial conditions: experiment 4’.

Test number	Homogenization cycles	Pressure (bar)	Petrolatum concentration (w/w)	Mean size (nm)	PDI
1’	4 (-1)	900	2.5% (-1)	261.8	0.452
2’	10 (0)	900	2.5% (-1)	155.1	0.160
3’	4 (-1)	900	5% (0)	175.9	0.262
4’	10 (0)	900	5% (0)	134.1	0.184

2.3. SLN characterization

2.3.1. Eugenol loading in SLNs

In order to determine the quantity of eugenol encapsulated in SLNs, eugenol was first of all extracted from the particles by adding 250 μ L of nanoparticle suspensions in 3mL of ethanol. This mixture was stirred during 5 min at 600 rpm. After centrifugation (15 min under 7800 rpm,

Eppendorf® 5418), supernatant was collected and eugenol was quantified by UV spectrophotometry. A preliminary study showed that one extraction in these conditions was enough to extract all eugenol from the SLNs (data not shown). In parallel, 400 µL of nanoparticle suspension was centrifuged at 14,000 rpm for 30 min with microfilters of 10 kDa to separate the nanoparticles from the dispersant medium. Then, the dispersant medium was collected and analyzed by UV spectrophotometry after dilution in 1 mL of ethanol. This analysis corresponded to the quantity of “non encapsulated” eugenol, i.e. eugenol not encapsulated in the nanoparticles. Each sample was measured twice. The encapsulation efficiency percentage (EE %) and the recovery of eugenol (%recovery) were determined as follows:

$$EE\% = \left[\frac{\text{weight of eugenol} - \text{weight of "non encapsulated" eugenol}}{\text{initial weight of eugenol in the preparation}} \right] \times 100$$

$$\% \text{ recovery} = \left[\frac{\text{weight of eugenol}}{\text{initial weight of eugenol in the preparation}} \right] \times 100$$

Eugenol quantification was performed by UV spectrophotometry (CARY 50 PROBE Varian material with CARY Win UV software). At first, a spectrum was recorded with slow scattering between 500 and 200 nm to define the wavelength of maximal absorption. Eugenol presented a maximal absorption band at 280 nm. Three regression lines were drawn with six concentrations of eugenol in the range $[1.20 \cdot 10^{-8} \text{ g/g to } 4.0 \cdot 10^{-5} \text{ g/g}]$; the regression slope was calculated with the average of the three values. It was fixed at $8.7 \cdot 10^{-5} \text{ g/g}$ and correlation coefficient R^2 was higher than 0.998.

2.3.2. Size distribution and zeta potential

SLN size distribution was determined by photon correlation spectroscopy (Zeta Sizer Nano ZS, Malvern Instrument). SLNs suspensions were diluted in deionized water (pH comprised between 6 and 7) at 25°C before analysis. The analysis model was multimodal narrow modes (high resolution) with a display range between 0.3 and 10 000 nm. Results were the average of 3 measurements per sample and 14 runs per measure. This instrument measured the mean size and the polydispersity index (PDI), representative of the width of the size distribution. Zeta potential was measured using an interferometric laser called M3 Phase Analysis Light Scattering (Zeta Sizer Nano ZS, Malvern

Instrument). 20 μL of SLNs suspension were diluted in 2 mL of deionized water before the measurement and Zeta potential was calculated by Smoluchowski equation from the electrophoretic mobility of nanoparticles.

2.3.3. Scanning electron microscopy (SEM)

SLN morphology was determined by SEM analysis using a microscope Hitachi, S800 FEG. SLN aqueous suspension droplets were dripped onto carbon adhesive rubber. Water was removed at 40°C overnight. Then, samples were metalized with 10 nm of platinum in an evaporator by cathodic sputtering. The observation was performed under a 25 kV voltage.

2.3.4. Fourier transformed infrared spectroscopy

Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) was performed on PIKE Technologies GladiATR FTIR spectrometer with IR Solution software to determine the presence and the distribution of eugenol into petrolatum SLNs. The water in samples was evaporated in an oven at 40°C overnight. Samples were analyzed without initial preparation. Spectrum was recorded from 4000 cm^{-1} to 40 cm^{-1} . Three measurements were performed for each sample and the blank background was adjusted before each acquisition. Pure eugenol (E), petrolatum (P), a mixture of petrolatum and eugenol (petrolatum +E) without nanoparticles and eugenol loaded into SLNs (E –SLNs) were analyzed.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. High pressure homogenization – process optimization

HPH has emerged as a reliable and powerful technique for the preparation of SLNs. In this process, liquid is pushed under high pressure (100 to 1,000 bar) through a narrow gap (few micrometers wide). The fluid is subjected to a drastic acceleration and the particles or the droplets are broken by high velocity, high shear and cavitation forces resulting in particle size in the nanometer range [32]. Here, HPH was used to prepare petrolatum SLNs loaded with eugenol. A homogenization cycle represents the duration required for the entire sample to flow through the high pressure zone. Usually, several homogenization cycles are needed to achieve the optimal size but it depends on the pressure applied,

the amount of sample and the lipid concentration [29]. In order to design an optimal formulation, the first step was to identify the parameters having an influence on the particle properties. In this purpose, we choose to apply the experimental design methodology, as experimental designs are commonly used to analyze simultaneously the influence of several variables of different nature on the properties of the final product [33]. In our study, the factors were noticed (bi) and their corresponding regression coefficients also called contrast coefficients were calculated as the difference between the average of results obtained with the parameters fixed at the high (+) and the low (−) levels. This coefficient represents the effect of the studied factor.

Table 3. Statistical analysis of the results obtained with the experimental design 1. Regression coefficient, Standard error and corresponding t_{exp} for each factor. Significant threshold was noted * when significant at the 95% level, ** when significant at the 99% level, *** when significant at the 99.9% level and ns when non-significant.

Factor	Influence on size				Influence on PDI			
	RegressionCoefficient	Standard error	t_{exp}	Significant threshold	Regression Coefficient	Standard error	t_{exp}	Significant threshold
b0	191.32	4.13	46.3	<0.01***	0.213	0.0072	29.47	<0.01***
b1	0.77	4.13	0.19	86.3	-0.0005	0.0072	-0.07	94.9
b2	-21.18	4.13	-5.12	1.44*	-0.01895	0.0072	-2.7	7.4
b3	26.22	4.13	6.35	0.791**	0.08	0.0072	11.07	0.158**

A first experimental design was performed to evaluate the influence of the petrolatum concentration, the number of homogenization cycles and the homogenization pressure on the mean size of particles and the size distribution (through the PDI value). All these data are reported in Table 1. Results show a mean size varying between 142.1 nm (test 5) and 239.5 nm (test 3). The lowest value of PDI was 0.113 (test 1), it was associated with a low mean size (144.7 nm). The experimental design was analyzed with NemrodW software and the results of statistical analysis were given in Table 3. The coefficients b_0 to b_3 represent the influence of the corresponding parameters, the highest value of the coefficient represents the most influent parameter. The Standard deviation (σ) was calculated using the results of test from 5 to 8; it represents the variance on the measurements. The

standard deviation was 16.5 nm for the mean size and 0.029 for the PDI. These values are reported in the Figure 2 (dashed lines).

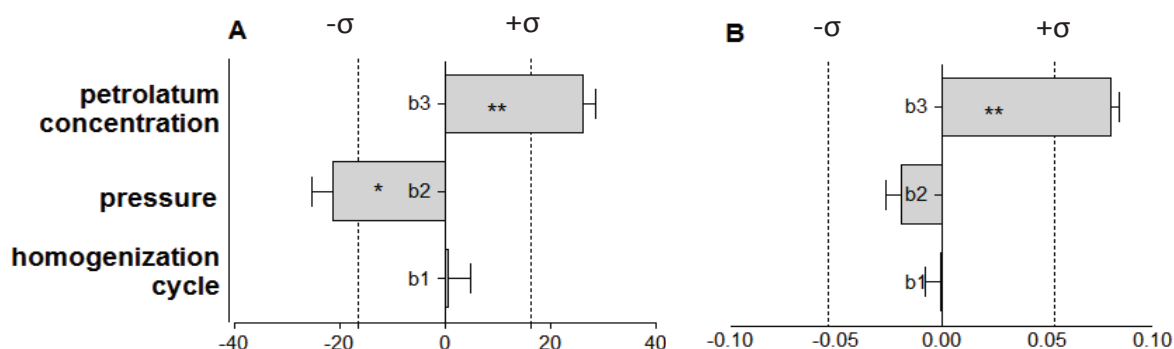


Figure 2. Graphical representation of the influence of each parameter (first experimental design). A – Influence on the mean size of petrolatum SLNs, B – Influence on the PDI of the size distribution of petrolatum SLNs.

Figure 2 shows that the number of cycles (b1) had no influence on the mean size and the PDI. This result can be explained by the range of variation of this parameter. The number of cycles was comprised between 10 and 20; this could be too high to observe any influence. Some results were published with a lower number of cycles, for example 3 or 5 cycles were considered enough to achieve a minimal size [34, 35]. The petrolatum concentration (b3) was the most important parameter, influencing both the mean size and the PDI. As regards the pressure (b2), it had a statistically significant influence on the mean size but not on the PDI, even if an increase of the pressure led to a slight decrease of the PDI.

Severino *et al.* [36] developed SLNs based on 10 % (w/w) crodamol® CP (an ester derived from palmitic acid and cetyl alcohol), 3.5 % (w/w) polysorbate 80 and 1.5 % (w/w) sorbitan trioleate (span 85). SLNs were produced by 3 cycles HPH using different pressures (500, 700 and 900 bar). They showed that the pressure influenced the size of the particles. Smaller particles were obtained with 900 bar due to the high energy supplied to the system in accordance with our results. Liu *et al.* [34] used HPH with 500 bar pressure for the preparation of isotretinoin loaded into glyceryl distearate (25 % w/w) SLNs and obtained mono-disperse particles with sizes comprised between 120 and 140 nm. An

increase of the pressure (800 bar) decreased the particle size down to 50 nm. Furthermore, Liu *et al.* also reported that increasing the number of homogenization cycles could contribute to the aggregation of particles and contribute to a higher value of PDI. The optimum number of cycles was fixed at 3 [34]. The number of cycles required to achieve a given size also depends on the initial size of droplets after the pre-emulsion; if this size is smaller, a lower energy is necessary to obtain the same final particle size [37]. In our study, the droplet size after pre-emulsion was 8.9 μm (± 1.3) but the number of cycles was high and no influence could be observed between 10 and 20. Shi *et al.* [38] prepared β -elemene-loaded nanostructured lipid carriers (2-6 %) with a mixture of glyceryl monostearate and liquid lipids (maisine® 35-1 and labrafil® M1944 CS) and applied variable numbers of homogenization cycles and pressures. The optimal conditions were obtained with a pressure of 800 bar and 8 homogenization cycles. They reported that the increase of the number of homogenization cycles produced a decrease of the system temperature and could therefore increase the mean size and the PDI of the preparation. Muchow M *et al.* [35] reported typical homogenization parameters in accordance with the literature; a pressure of 500 bar and 5 homogenization cycles led to a reduction in the particle size to approximately 220 nm and a narrow size distribution.

The influence of the lipid concentration during HPH process is not reported in the literature. Usually, this concentration is high (10 % or more) in order to produce a concentrated SLN suspension and increase the quantity of active ingredient in the formulation. However, we observed that this parameter was the most influent, increasing the concentration results in larger particles and in a broader size distribution.

By considering these first results, we choose to investigate lower concentration range and lower number of homogenization cycles and we performed a second experimental design.

Table 4. Statistical analysis of the results obtained with experimental design 2. Regression coefficient, Standard error and corresponding t_{exp} for each factor. Significant threshold was noted * when significant at the 95% level, ** when significant at the 99% level, *** when significant at the 99.9% level and ns when non-significant.

Factor	Influence on size				Influence on PDI			
	Regression Coefficient	Standard error	t_{exp}	Significant threshold	Regression Coefficient	Standard error	t_{exp}	Significant threshold
b'_0	181.72	4.13	43.98	<0.001***	0.2645	0.0535	4.94	12.7
b'_1	-37.13	4.13	-8.98	0.291**	-0.0925	0.0535	-1.73	33.4
b'_3	-26.72	4.13	-6.47	0.750**	-0.0415	0.0535	-0.78	58

The first experimental design showed that the mean size and the PDI decrease with an increase of the pressure (900 bar was the highest value possible with our equipment) and a decrease of the petrolatum amount. Consequently, the pressure was fixed at its maximum value and the petrolatum concentration decreased below than 5 % (Table 2). In order to investigate the influence of the number of homogenization cycles, lower values (lower than 10) were tested. The results were presented in Table 2, statistical analysis is reported in Table 4 and the influence of the two coefficients is represented in Figure 3. The number of homogenization cycles (b'_1) and the petrolatum concentration (b'_3) influenced only the mean particle size, a decrease of both parameters resulting in an increase of the mean size. The same tendency was observed on the PDI, but the influence was not significant, in accordance with the results of Severino *et al.* [36] showing that PDI was not significantly influenced by the formulation parameters. As the number of homogenization cycle decreases from 10 to 4, the mean size increased whatever the petrolatum concentration.

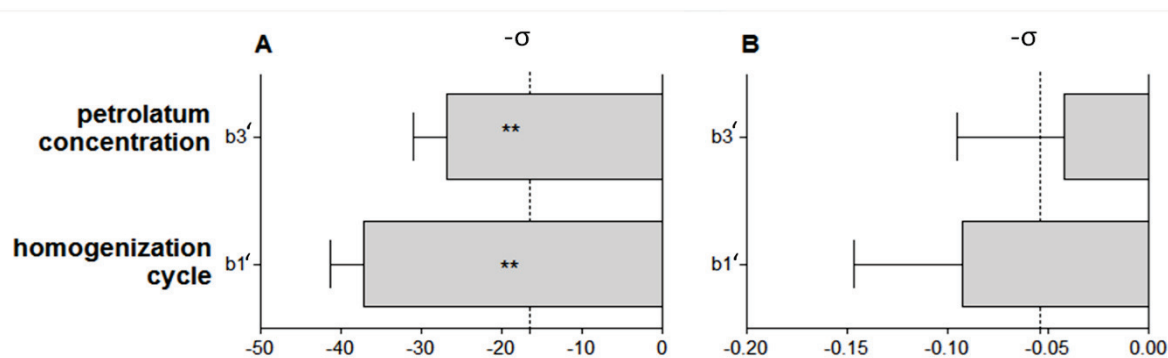


Figure 3. Graphical representation of the influence of the parameters (second experimental design). A – Influence on the mean size of petrolatum SLNs, B – Influence on the PDI of the size distribution of petrolatum SLNs.

In our study, a decrease of the petrolatum concentration from 10 % to 5 % (w/w) resulted in a decrease of the mean size of particles which increased again with a petrolatum concentration below 5 % (w/w). The concentration of 5 % seemed to be an optimum value resulting in the minimal mean particle size. This result is in accordance with Martins *et al.* which prepared glyceryl trimyristate SLNs with HPH at 500 bar. They reported that the viscosity of SLN suspensions increased with the volume fraction of lipids from 5 % to 15 %, and observed an increase of the mean size and PDI proportional to the lipid concentration [39]. However, lower concentrations were not studied by these authors.

The optimum parameters in our case were a pressure of 900 bar, 10 homogenization cycles and 5% of petrolatum to prepare particles with a mean size of 134.1 nm and a PDI of 0.184. These results differ from those of the literature [34, 36, 38] but the formulation and the equipment also differ and it seems that the conditions should be adapted to each case. Nevertheless, this preparation was in accordance with our criteria.

3.2. High shear homogenization combined with ultrasounds (ES)

This process was developed in previous experiments (data under publication) and optimal conditions were selected to prepare petrolatum SLNs. A pre-emulsion was performed to obtain monodisperse droplets and ultrasounds were used to reduce the mean size and the PDI of the droplets.

Two parameters influenced this process, the power of ultrasounds and the duration of application. The size was inversely proportional to the ultrasound power and the time of application until critical values fixed at 300W and one minute. Ultra-sonication combined with high shear homogenization process (ES) is frequently studied at the lab scale, because these two steps are easy to handle. However, in certain cases, the dispersion quality is compromised by the presence of metallic particles providing from the probe leading to a contamination of the suspension. In many cases reported in the literature, a long duration of ultrasonication (> 15 min) is required to achieve small sizes ranging between 100 and 200 nm [29]. No general rule can be established for the preparation of SLNs with this method [29]. For the step of emulsion, Ahlin *et al.* showed that higher stirring rates did not significantly influence the size of the droplets but slightly improved the PDI [31]. In our study, pre-emulsion was stirred during 15 min under 24,000 rpm and ultrasounds were performed at 300 W during 1 min to obtain blank SLNs (without eugenol encapsulated) with a mean size of 193.5 nm and a narrow size distribution (PDI = 0.146).

3.3. Comparison of the two processes

Both processes need a pre-emulsion step which was performed by high shear stirring in the same conditions (24,000 rpm during 15 min). The pre-emulsion had a mean size of $8.9 \mu\text{m} (\pm 1.3)$ and was quite monodisperse.

Our objective was to compare the two processes consequently the same lipid concentration was used in each case. However, it could be quite different as it is recognized that HPH can be performed with concentrated emulsions; the lipid concentration can be close to 40 % [40]. On the contrary, it is difficult to disperse high lipid concentrations homogeneously by probe sonication and this technique is limited to lipid concentrations lower than 10 % [29]. Regarding this parameter, HPH is attractive because a high lipid content results in a high concentration of SLNs in suspension and thus in a high active concentration.

SLNs prepared by HPH and by ES presented different mean sizes (134.1 nm for HPH and 193.5 nm for ES). This result could be linked to the mechanism of dispersion and the energy provided to the system. The dispersion quality depends on the power density and its distribution in the emulsion

volume. High power densities result in more effective droplet disruption and also in lower mean particle size. HPH reaches by far the highest power densities and it is characterized by a homogenous power distribution due to the small size of the homogenizing gap (25–30 μm) [29]. ES provides a lower power and it is was also reported by Varshosaz *et al.* that smaller size can be achieved with HPH compared to ES [29]. Furthermore, the power distribution in the dispersion volume with ES is not homogenous; maximal power is delivered in the volume around the probe and it decreases exponentially when moving away from the probe. So the forces applied on the droplets are variable and depend of the droplet localization. In our study, the size distribution was narrow with both processes and the PDI were not statistically different. This can be explained by the small volume of the preparation, allowing a quite good dispersion of the ultrasounds in the entire volume.

3.4. Eugenol loaded petrolatum SLNs

Table 5. Properties of eugenol loaded SLNs prepared with HPH and ES processes. Significant threshold was noted * when significant at the 95 % level, ** when significant at the 99 % level, *** when significant at the 99.9 % level and ns when non-significant.

	HPH process	ES process	P value
Mean size (nm)	128.5 (\pm 5.2)	194.6 (\pm 3.2)	P <0.0001 ***
PDI	0.186 (\pm 0.025)	0.162 (\pm 0.034)	0.3804 – ns
Zeta potential (mV)	-30.2 (\pm 2.7)	-29.4 (\pm 1.8)	0.6914 – ns
EE%	88.5 (\pm 0.6)	91.6 (\pm 0.4)	P <0.0001 - ***
recovery%	95.5 (\pm 0.4)	96.3 (\pm 0.5)	0.0965 - ns

Table 5 shows the influence of the production process on the SLN properties, particle mean size, PDI, EE% and recovery%. Both preparations corresponded to our criteria with a mean size below 200 nm and a narrow size distribution (PDI < 0.2). The Zeta potential was negative, with a high value (close to -30 mV in both cases) indicating a good physical stability of the suspensions. The Zeta potential, the recovery% and the PDI of the two preparations were not statistically different. As already observed with unloaded SLNs, HPH allowed obtaining a lower mean size (128.5 nm (\pm 5.2)

versus 194.6 nm (± 3.2) with ES, $p < 0.0001$). However, the mean size of SLNs obtained by ES remained lower than 200 nm, consequently it can be considered as satisfying. Furthermore, the best encapsulation was achieved with ES, 91.6% (± 0.4) versus 88.5% (± 0.6) with HPH ($p < 0.0001$). The SEM analysis showed nanoparticles with spherical shape for both processes (Figure 4A & 4B). Considering all the results and especially the encapsulation efficiency, ES can be considered as the most suitable technique for the encapsulation of eugenol into SLNs, even if HPH also provide satisfying SLNs.

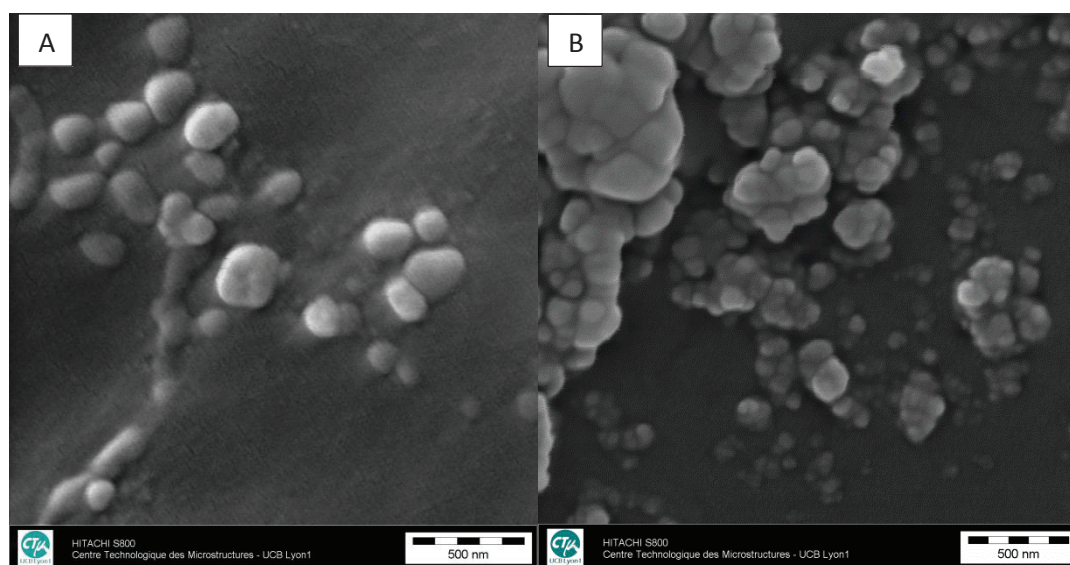


Figure 4. Scanning electron microscopy images of petrolatum SLNs prepared by ES (A) and HPH (B) (magnitude 80,000X). Scale bar represents 500 nm.

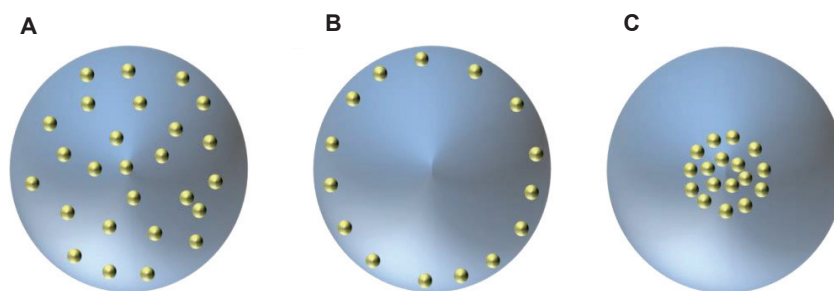


Figure 5. Schematic representation of the drug distribution into SLNs. A – solid solution model, B- core-shell model with drug-enriched shell, C- core-shell model with drug-enriched core.

The last part of the study was dedicated to the analysis of eugenol distribution into SLNs. According to Muller, SLNs could present three structures called solid solution (Figure 5A), core-shell drug-enriched shell (Figure 5B) and core-shell drug-enriched core (Figure 5C) [41]. In order to determine the structure of the SLNs and the distribution of eugenol, we performed FTIR on the raw materials and on the SLNs [42]. The results are presented in Figure 6 and Table 6.

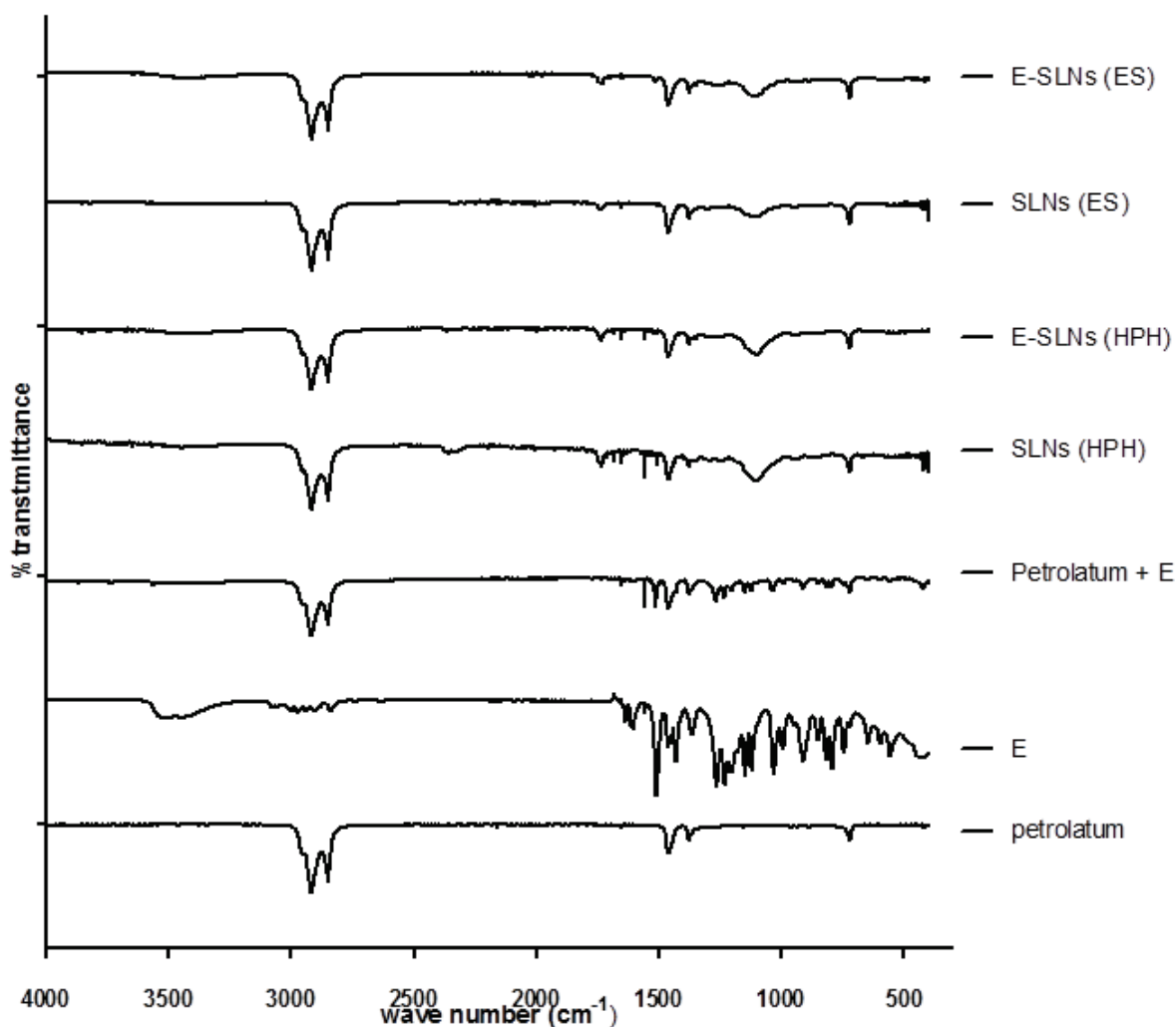


Figure 6. Fourier transformed infrared spectroscopy recorded between 400 and 4000 cm^{-1} . E : pure eugenol, petrolatum : pure petrolatum, petrolatum + E : mixture of eugenol and petrolatum, E-SLNs (HPH) : eugenol loaded SLNs prepared by high pressure homogenization, SLNs (HPH) : unloaded SLNs prepared by high pressure homogenization, E-SLNs (ES) : eugenol loaded SLNs prepared by emulsion-sonication ; SLNs (ES) : unloaded SLNs prepared by emulsion-sonication.

Table 6. Wavelength of the characteristic bands. The bands corresponding to eugenol in SLNs are highlighted.

Eugenol	SLNs (ES)	E-SLNs (ES)	SLNs (HPH)	E-SLNs (HPH)
596				
648				
720	720	720	720	720
745				
793				
816				
851				847
912				889
			934	932
947				953
993				
1032		1039		
	1101	1103	1101	1101
	1109			
1121				
1148				
1182				
1204				
1231				
	1246	1246	1244	1244
1263		1267		1298
	1350	1348	1350	1350
1364				
	1377	1377	1375	1375
1431				
1451				
1464	1462	1454	1456	1454
1510				
1605				
1638				
	1736	1736	1734	1734
2841	2849	2849	2849	2849
2905	2916	2916	2916	2916
2938	2953	2953	2953	2953
2974				
3003				
3075				
3331				
3404				
3422				
3433				
3505				

Petrolatum is a mixture of different alkanes and the spectrum presented three characteristic bands at 2848, 2918 and 2953 cm^{-1} corresponding to asymmetric and symmetric infrared stretching of alkanes C-H_2 and C-H_3 . No absorption band was recorded between 1000 and 400 cm^{-1} (Figure 6). The spectrum of eugenol was characterized by the presence of bands in the 1000-400 cm^{-1} domain corresponding to the bending of $=\text{C-H}$ bounds, bands between 1750 and 1450 cm^{-1} corresponding to the stretching of C=C bounds of aromatic compounds of alkene, and a band at 1263 cm^{-1} corresponding to the stretching of C-O bounds of phenolic compounds. Spectra of eugenol and petrolatum showed common peaks at 2840, 2905 and 2950 cm^{-1} (Figure 6).

The characteristic peaks of eugenol and petrolatum can be identified in the spectra of SLNs and of the mixture. However, the ratio of petrolatum to eugenol being 10, the peaks characteristic of eugenol had lower intensity in the mixture and in the SLNs. SLNs prepared with the two processes showed a similar spectrum indicating a similar structure. When eugenol was encapsulated, only two or four of its characteristic peaks appeared in the SLN spectrum. This could be explained by chemical interactions between the reactive groups of eugenol and the petrolatum matrix or by physical interaction between eugenol and petrolatum. The low content of eugenol could also explained that peaks were not detected. Considering SLNs prepared by ES process, the presence of two bands in the E-SLNs (ES) spectrum, one at 1040 cm^{-1} corresponding to $=\text{C-H}$ stretching of alkenes or aromatic compounds, and the other at 1267 cm^{-1} corresponding to $=\text{C-O-C}$ stretching or C-O stretching of phenol, indicated the presence of eugenol in the structure. The same peak at 1298 cm^{-1} corresponding to $=\text{C-O-C}$ stretching or C-O stretching of phenol was observed in the spectrum of SLNs produced by HPH, there were also bands at 847, 889, 953 cm^{-1} corresponding to C=C-H bending of aromatic compounds, all prove the encapsulation of eugenol in the particles. However, it was not possible to establish differences between the structures of both types of SLNs.

4. CONCLUSION

Petrolatum SLNs containing eugenol were prepared with usual processes including high pressure homogenization and high shear homogenization combined with ultrasonication. Fixed criteria were a mean size of particles below 200 nm, a narrow size distribution ($PDI < 0.2$) and a high encapsulation efficiency. Both processes allowed achieving these objectives.

HPH process was optimized through the use of experimental designs to prepare particles responding to the criteria. Three parameters had an influence on the particle size and the PDI: the petrolatum concentration, the homogenization pressure and the number of homogenization cycles. Optimal formulation was prepared with 5 % w/w of petrolatum, 10 cycles and a pressure of 900 bar. For emulsion-sonication, a pre-emulsion was performed during 15 min under 24,000 rpm then ultrasounds were applied at 300 W during 1 min.

Eugenol was encapsulated into the SLNs prepared by the two processes. The properties of loaded SLNs also respond to the formulation criteria and high encapsulation efficiency close to 90% was recorded. SLN produced by HPH presented a lower size compared to the other process. However, the encapsulation efficiency was higher with ES process. Fourier transformation infra-red spectrometry showed that eugenol was dispersed into SLNs prepared with these two processes. Further investigation on the stability of these carriers and on the eugenol release should be performed.

5. ACKNOWLEDGES

This project was supported by a Research grants from French research Minister of Angele Cortial PhD thesis. We thank the “Centre technologique des microstructures” of Lyon1 University for SEM images.

6. REFERENCES

- [1] T. G. Rodrigues, A. J. Fernandes, J. P. B. Sousa, J. K. Bastos and J. M. Sforcin, *Nat. Prod. Res.* 23, 319 (2009)
- [2] B. Yogalakshmi, P. Viswanathan and C. V. Anuradha, *Toxicology*. 268, 204 (2010)
- [3] D. Campaniello, M. R. Corbo and M Sinigaglia, *J. Food Prot.* 73, 1124 (2010)

- [4] S. K. Mahapatra, S. P. Chakraborty, S Majumdar, B.G. Bag, S. Roy, *Eur. J. Pharmacol.* 623, 132 (2009)
- [5] M.J. O'Neil, Editor, *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 14th ed, Merck, New Jersey (2006)
- [6] C. Turek and F. C. Stintzing, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13, 177 (2014)
- [7] V. Sanna, N. Pala and M. Sechi, *Int. J. Nanomed.* 9, 467 (2014)
- [8] C. R. C. Grando, C. A. Guimarães, L. P. Mercuri, J. R. Matos, and M. H. A. Santana, *J. Colloid Sci. Biotechnol.* 2, 140 (2013)
- [9] T. Delmas, A. Fraichard, P. A. Bayle, I. Texier, M. Bardet, J. Baudry, J. Bibette, and A. C. Couffin, *J. Colloid Sci. Biotechnol.* 1, 16 (2012)
- [10] A. A. Attama, *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 5, 178 (2011)
- [11] M. Garcia-Fuentes, C. Prego, D. Torres and M. J. Alonso, *Eur. J. Pharm. Sci.* 25, 133 (2005)
- [12] K. Manjunath and V. Venkateswarlu, *J. Control. Release*, 107, 215 (2005)
- [13] M. J. Tsai, Y. B. Huang, P. C. Wu, Y. S. Fu, Y. R. Kao, J. Y. Fang and Y. H. Tsai, *J. Pharm. Sci.* 100, 547 (2011)
- [14] J. Varshosaz, M. Tabbakhian and M. Y. Mohammadi, *J. Liposome Res.* 20, 286 (2010)
- [15] V. V. Kumar, D. Chandrasekar, S. Ramakrishna, V. Kishan, Y. M. Rao and P. V. Diwan, *Int. J. Pharm.* 335, 167 (2007)
- [16] B. Sarmiento, S. Martins, D. Ferreira and E. B. Souto, *Int. J. Nanomedicine*, 2, 743 (2007)
- [17] V. Kakkar, S. Singh, D. Singla and I. P. Kaur, *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 495 (2011)
- [18] L. Hu, Q. Xing, J. Meng and C. Shang, *A. A. P. S. Pharm. Sci. Tech.* 11, 582 (2010)

- [19] Y. Luo, D. Chen, L. Ren, X. Zhao and J. Qin, *J. Control. Release*, 114, 53 **(2006)**
- [20] R. Yang, R. Gao, F. Li, H. He and X. Tang, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 37,139 **(2011)**
- [21] S. Martins, A. C. Silva, D. C. Ferreira and E. B. Souto, *J. Biomed. Nanotechnol.* 5, 76 **(2009)**
- [22] J. Varshosaz, S. Ghaffari, M. R. Khoshayand, F. Atyabi, S. Azarmi and F. Kobarfard, *J. Liposome Res.* 20, 97 **(2010)**
- [23] K. Pathak, L. Keshrin and M. Shah, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 28, 357 **(2011)**
- [24] N. Kathe, B. Henriksen and H. Chauhan, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **(2014)** [Epub ahead of print]
- [25] A.Kovacevic, S. Savic, G. Vuleta, R. H. Müller and C. M. Keck, *Int. J. Pharm.* 406, 163 **(2011)**
- [26] P. Li, A.Ghosh, R. F. Wagner, S. Krill, Y. M. Joshi and A. T. Serajuddin. *Int. J. Pharm.* 288, 27 **(2005)**
- [27] A. Radomska-Soukharev, *Adv. Drug Deliv Rev.* 59, 411 **(2007)**
- [28] S. A. Wissing, O. Kayser and R. H. Müller, *Adv. Drug Deliv Rev.* 56, 1257 **(2004)**
- [29] W. Mehnert and K. Mader K, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47,165 **(2001)**
- [30] A. J. Domb, Lipospheres for controlled delivery of substances, U. S. Patent 5,188,837, Feb 23 **(1993)**
- [31] P.Ahlin, J. Kristl and J. Smid-Kobar, *Acta. Pharm*, 48, 257 **(1998)**
- [32] J. P. Möschwitzer, *Int. J. Pharm.* 453, 142 **(2013)**
- [33] N. F.S. de Melo, E. V. R. Campos, E. de Paula, A. H. Rosa and L. F. Fraceto, *J. Colloid Sci. Biotechnol.* 2, 146 **(2013)**
- [34] J. Liu, W.Hu, H. Chen, Q. Ni, H. Xu and X. Yang, *Int. J. Pharm.* 328, 191 **(2007)**
- [35] M. Muchow, P. Maincent and R. H. Muller, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 12,1394 **(2008)**

- [36] P. Severino, M. H. Santana and E. B. Souto, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 32, 1375 (2012)
- [37] R. Parhi and P. Suresh, *Curr. Drug. Discov. Technol.* 9, 2 (2012)
- [38] F. Shi, G. Yang, J. Ren, T. Guo, Y. Du and N. Feng, *Int. J. Nanomedicine*, 8, 2533 (2013)
- [39] S. Martins, I. Tho, D. C. Ferreira, E. B. Souto and M. Brandl, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 37:815 (2011)
- [40] A. Lippacher, R. H. Muller and K. Mader, *Int. J. Pharm.* 196, 227 (2000)
- [41] R. H. Müller, K. Mäder and S. Gohla, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 161 (2000)
- [42] D. A., Campos, A. R. Madureira, A. M. Gomes, B. Sarmiento and M. M. Pintado, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 115, 109 (2014)

Hot homogenization process optimization for fragrance encapsulation in solid lipid nanoparticles

(Accepted with major revision in Flavour and Fragrance Journal)

Short title: Fragrance encapsulation in SLN by hot homogenization process

Cortial A^{1,2a}, Vocanson M^{2b}, Loubry E^{1c}, Briançon S^{1d}

¹Université de Lyon, F-69622, Lyon, France, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, France

²Université de Lyon, F-69622, Lyon, France, Université Lyon 1, ENS Lyon, INSERM U1111 – CNRS UMR5308, Centre de Recherche en Infectiologie, France

^aangele.cortial@univ-lyon1.fr

^bmarc.vocanson@inserm.fr

^celfie.loubry@etu.univ-lyon1.fr

^dstephanie.briancon@univ-lyon1.fr

Corresponding author

Stéphanie Briançon

Université Lyon 1, LAGEP,

43 bd du 11 Novembre 1918

Bâtiment CPE

69622 Villeurbanne Cedex

France

Tel: +33478777110

Fax: +33472431682

ABSTRACT

Solid lipid nanoparticles (SLN) loaded with a fragrance mix were prepared using a hot homogenization process coupled with ultrasounds. The objective was to develop a simple process adjustable to several kinds of lipids. The process comprised two steps: a pre-emulsion of the melted lipids in water followed by a size reduction by sonication, before cooling. The study of several formulation parameters showed that the size distribution of SLNs depended essentially on the sonication step, and especially on the ultrasounds power and time. Five types of SLNs loaded with fragrance mix were produced, based on petrolatum, candelilla, shea butter, C10-18 triglycerides, and cetyl palmitate. The size distribution was below 200 nm with a narrow size distribution. Moreover, high encapsulation efficiency was obtained, at least 66.5% (± 0.5) for petrolatum SLNs and 94.9% (± 0.5) for cetyl palmitate SLNs. A correlation between the partition coefficient of the molecules and the encapsulation efficiency was established for all lipids except cetyl palmitate. Cetyl palmitate, candelilla and petrolatum SLNs were stable for at least one month at 4°C and 25°C.

Keywords: solid lipid nanoparticles, fragrance mix encapsulation, sonication, and hot homogeneization.

1. Introduction

Many technologies were used for fragrance encapsulation such as inclusion into complexes (cyclodextrins), incorporation in solid lipid particles (SLNs) by complex coacervation, by polymerization, by extrusion methods or by spray drying... These methods can be classified into two types including physico-chemical and mechanical processes. All of them are available to encapsulate fragrances into small particles with a size ranging between 50 nm and 2000 μm . Many materials can be used as carrier such as natural or modified polysaccharides, gums, lipids, protein materials, and a large numbers of synthetic polymers^[1]. Most of the methods are based on the formation of a single or multiple emulsions. The type of emulsions *i.e.* water in oil or oil in water depends on the process and the used materials.

Spray-drying and extrusion are mechanical processes. Spray drying is largely used in food industry as it is economical and fast. Fragrances are dispersed in carrier solution with a stirring rate adjusted in order to obtain droplets with the suitable size. Then, the emulsion is atomized into a spray chamber to remove water or solvent from the droplets and form particles. The main advantage is the production of a very stable dry powder and the possible encapsulation of heat-labile actives without any degradation^[2-5]. The extrusion technique consists in dissolving the fragrance in the melted carrier material, or introducing the fragrance during the extrusion of the carrier. Particles with a small size and a narrow distribution can be obtained according to the extruder parameters (screw configuration and speed, temperature, extrusion die)^[6,7].

Many physico-chemical processes also based on an emulsion step are developed. Coacervation is the most frequently used for fragrance microencapsulation. However, these microparticles often present a weak mechanical resistance^[8]. The *in situ* polymerization process consists in preparing a stable emulsion of fragrance and adding monomers or pre-polymers. Polymerization is then induced by heating or adding a chemical initiator. For example, this method was used to prepare polymethylmethacrylate (PMMA) microspheres containing 2-phenylethanol^[9]. Interfacial polymerization is also used to encapsulate fragrances. All these methods are controlled by the emulsion step and the particle size distribution is linked to that of the droplets^[10,11]. Another encapsulation strategy is based on complexation with cyclodextrins. This is possible for hydrophobic small molecules such as fragrances^[12]. Inclusion depends on the type of cyclodextrins, the mass ratio of fragrance to cyclodextrin, and the inclusion time. These microparticles are largely used in the textile industry to retain flavors in textile^[13].

This study focused on the development of solid lipid nanoparticles (SLNs) encapsulating a mix of fragrances. SLNs present two main advantages: the toxicological safety and the possibility of large scale production^[14]. SLNs were developed in 1991 to propose an alternative to emulsions to overcome one of the major problems encountered with emulsions, *i.e.* the inability to provide sustained release of the drugs incorporated in oily droplets^[15-16]. These colloidal vectors were prepared with lipids in solid state at room temperature, thus the

drug mobility inside the nanoparticles was considerably decreased compared to liquid droplets [17]. SLNs present multiple advantages, including drug targeting and controlled release, increasing the drug stability, and the ability of sterilization [18]. SLNs can provide many potential applications in medicine for diseases treatment and diagnosis [19]. SLNs can be prepared with multiple methods such as high shear homogenization and ultrasounds [20], high pressure homogenization [21, 22], hot homogenization [23], cold homogenization [24], and emulsification/solvent evaporation [25]. Ingredients usually used for SLN preparation are lipids, water and surfactants as the dispersion phase. Table 1 lists the main lipids and surfactants used [17].

In this study, SLNs were prepared from fatty esters, alcohols and acids, hydrocarbons and triglycerides with a process based on emulsion – sonication. Non-ionic surfactants were used to stabilize the particles. These SLNs were loaded with a fragrance mix of seven molecules described in Figure 1, usually introduced in cosmetics products, air fresheners, household cleaning products, toilet paper. They are also used for diagnosis of allergy to fragrances [26, 27]. SLNs prepared may present a mean size lower than 200 nm and a polydispersity index (PDI) below 0.25 in order to realize a sterile filtration. The process of SLN preparation was first established with petrolatum to determine the influence of operating parameters. Then, the optimized process was applied to develop other SLNs based on different lipids.

Table 3. Compounds commonly used for SLN production (adapted from (Mehnert and Mäder, 2001))

Lipids		Emulsifiers
Triglycerides	Hard fats	
Tricaprin Trilaurin Trimyristin Tripalmitin Tristearin Hydrogenated coco-glycerides	Glyceryl monostearate Glyceryl behemate Glyceryl palmitostearate Glyceryl caprate Cetyl palmitate Witepsol W® 35 Witepsol E® 85 Witepsol S® 51 Witepsol S® 55 Stearic acid Palmitic acid Decanoic acid Behenic acid Acidan N12 Beeswax Carnauba Cacao butter should chek the speel cacao	Phospholipids Soybean lecithin Egg lecithin Phosphatidylcoline Ethylene oxide/propylene oxide copolymers Poloxamer 182 Poloxamer 188 Poloxamer 237 Poloxamer 238

2. Materials and methods

2.1. Materials

(α)-amyl-cinnamal, cinnamal, cinnamyl alcohol, eugenol, geraniol, hydroxycitronellal, and isoeugenol (Figure1) were purchased from Sigma-Aldrich. Polysorbate 80 (polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate) (Hydrophilic – lipophilic balance (HLB) =15.0), polysorbate 60 (polyoxyethylene 20 sorbitan monostearate) (HLB =14.9), polysorbate 40 (polyoxyethylene 20 sorbitan monopalmitate) (HLB =15.6), PEG-8 stearate (HLB =11), sorbitan oleate (HLB =4.3), sorbitan stearate (HLB =4.7), sorbitan palmitate (HLB =6.7), sorbitan laurate (HLB =8.6) and sorbitan sesquioleate (HLB =4.5) were provided from SEPPIC. PEG (polyethylene glycol)-35 castor oil (HLB =12.5), and poloxamer 188 (HLB >24) were purchased from

BASF. Laureth-4 (HLB =9.7), laureth-23 (HLB =16.9), ceteth-2 (HLB =5.3), ceteth-20 (HLB =15.7), steareth-2 (HLB =4.9), steareth-10 (HLB =12.4), and steareth-20 (HLB =15.3) were from Fluka. Polysorbate 65 (HLB =10.5) was purchased from ICI surfactants. The properties of the lipids are summarized in Table 2.

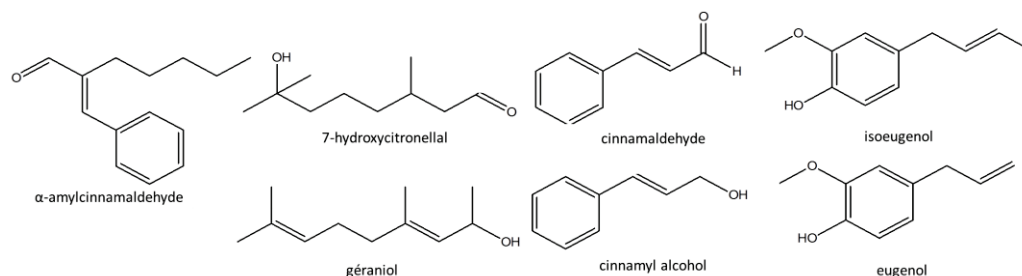


Figure 52. Components of the Fragrance mix loaded in SLNs

Table 2. Properties of the lipids used for SLN development

Lipids (International nomenclature of cosmetic ingredients)	Suppliers	Composition	HLB ^a	Melting point (°C)
Lipocire A Pellets® (C10-18 Triglycerides)	Gattefossé	Triglycerides	16	35
Candelilla Euphorbia antispyllitica (Candelilla) Wax	Baerlocher	Hydrocarbons (C29-C33), free fatty acids esters, free fatty alcohols, resins	14,5	70
Beeswax (Cera alba)	Cooper	free fatty acids esters, free fatty alcohols, hydrocarbons	12,5	62
Shea butter (Butyrospermum parkii)	Biofloral	Oleic acid, stearic acid, linoleic acid, palmitic acid, arachidic acid	8	35
Cetyl palmitate (cetyl palmitate)	Stéarinierie Dubois	Saturated fatty acids, free alcohols	10	50
Petrolatum (petrolatum)	Sigma- Aldrich	Hydrocarbons	11	37

^adata indicated by suppliers

2.2. Lipid characterization

Lipid viscosity was determined with a Rheometer Lamy CP100 Peltier System. Flow curves were plotted for each lipid. Gradient shear was increased from 10 s⁻¹ to 900 s⁻¹ in 2 min, held for 2 min at 900 s⁻¹, and decreased again until 10 s⁻¹ in 2 min.

2.3. SLN formulation

SLNs were prepared by hot homogenization in three steps. First, lipids, surfactants and water were heated at a temperature above the lipid melting point and oil in water emulsion was performed at this temperature by high shear mixing with a rotor stator (Ultra Turrax T25 Basic equipped with D8 rotor-stator, Ika). The shear stirring ranged between 19,000 and 24,000 rpm. Secondly, the droplet size and the size distribution were decreased by applying ultra-sounds in the medium with a probe providing variable power (from 100 W to 400 W) (Bioblock scientific vibra cell 75042 with plane probe of 13 mm), for a variable duration ranging between 30 s to 90 s. In the third step, the nanoemulsion was cooled down to 0°C in order to obtain SLNs dispersed in water. Several formulation and process parameters varied to study their influence on the particle size and the size distribution, when studying the influence of one parameter, the others were kept constant.

2.4. Petrolatum SLN development

2.4.1.1. Surfactant screening

Surfactants were used to increase the SLNs stability. The influence of the surfactant nature and amount was studied with a standard emulsion composed of petrolatum (20%), surfactant (2%) and deionized water (78%). Emulsification stirring rate and duration were fixed at 24,000 rpm and 300 s. Sonication time was 1 min and the power of the probe was 200 W. A screening was carried out to determine the optimal couple of surfactants (Table 3). This choice was based on the required hydrophilic-lipophilic balance (HLB_R) of petrolatum, which is 12 ± 1 according to Seiller M *et al.* [28]. The amounts of each surfactant in the couple were calculated in order to match the petrolatum HLB_R [29]. The surfactant concentrations are listed in Table 3. The size distribution of the emulsion was measured before sonication and at the end of the process after cooling. The stability of the preparation was evaluated by macroscopic observation after 7 days storage at room temperature.

Table 3. Petrolatum SNs: Surfactant screening, SLN mean size and polydispersity index (PDI), stability

Surfactant type and percentage (w/w)	Mean size before sonication (nm) and PDI	Mean size after sonication (nm) and PDI	Macroscopic characterization after 7 days
Polysorbate 80 (1.44%) sorbitan oleate (0.56%)	731(0.811)	184.5(0.206)	Aggregates
Polysorbate 60 (1.43%) sorbitan stearate (0.57%)	578.3 (0.817)	176(0.2012)	White suspension
Polysorbate 40 (1.19%) Sorbitan palmitate (0.81%)	581.0 (0.544)	169.4 (0.232)	White suspension
Laureth 4 (1.36%) Laureth 23 (0.64%)	535.0 (0.445)	229.0 (0.232)	White suspension
Ceteth 2 (0.69%) Ceteth 20 (1.31%)	629.1 (0.872)	259.7 (0.330)	Aggregates
Steareth 2 (0.63%) Steareth 20 (1.37%)	887.0 (0.838)	278.6 (0.364)	Aggregates

PEG-8 Stearate (2%)	326.8 (>1)	242.6 (0.586)	Aggregates
PEG-35 castor oil (2%)	3777 (0.365)	238.3(0.260)	Aggregates

2.4.1.2. Influence of process parameters

2.4.1.2.1. Influence of petrolatum and surfactant amount

The influence of the emulsion step on SLN mean size and PDI was investigated by varying petrolatum and surfactant amounts. The couple of surfactants chosen were polysorbate 40 and sorbitan palmitate. The amount of each surfactant was calculated to achieve a HLB of 12^[28]. The ratio of petrolatum to surfactant amount was fixed at 10. Petrolatum concentration in the emulsion varied from 5 to 20% (w/w), so total surfactant varied from 0.5% to 2% w/w. The other parameters were fixed as for the surfactant screening study: emulsification at 24,000 rpm during 300 s and sonication at 200 W during 60 s.

2.4.1.2.2. Influence of the emulsification step

Experiments were carried out by varying the stirring rate and the emulsification duration, the other parameters being kept constant. Emulsion was composed of 5% petrolatum, 0.34% polysorbate 40, 0.16% sorbitan palmitate and 94.5% deionized water. Three stirring rates were applied: 19,000; 22,000 and 24,000 rpm and the size distribution was measured regularly *i.e.* at 60, 120, 300 600, 900, 1800, 2700, 3600, 4500 s.

2.4.1.2.3. Influence of the sonication step

The influence of sonication power and duration was measured with the same emulsion content: 5% petrolatum, 0.34% polysorbate 40, 0.16% sorbitan palmitate and 94.5% deionized water. Emulsion step parameters were 300 s and 24,000 rpm. To study the influence of the sonication time, the power was set to 200 W and the duration varied from 30 s to 90 s. To study the influence of the power sonication, the time was fixed at 60 s and the power varied from 100 W to 300 W. Power higher than 400 W and duration higher than 90 s led to the destabilization of the emulsion due to a temperature increase in the medium.

2.4.1.3. Preparation of SLNs with the optimal protocol

The standard protocol established for petrolatum-SLNs was applied for developing other SLNs based on different lipids used in cosmetology and pharmacy (Table 2).

2.4.1.3.1. Standard protocol

The lipids were melted at a temperature above their melting point and then dispersed in by a rotor stator (Ultra-turrax T25 Basic IKA-Werke with D8 rotor-stator) during 300 s under 24,000 rpm. These coarse emulsions were then homogenized by sonication during 1 min under 200 W. The amount of lipids in the formulation was fixed to 5%. As already done with petrolatum, a screening of surfactants was carried out in order to determine the optimal conditions (Table 4).

Table 4. SLNs development: lipids, surfactants, mean size and PDI

Lipids	TA ₁ and ratio lipid to surfactant 1	TA ₂ and ratio lipid to surfactant 2	Mean size (nm)	Polydispersity index
C10-18 triglycerides	Polysorbate 40 (10)	-	245.8	0.268
	Ceteth 20 (10)	-	238	0.443
	Poloxamer 188 (10)	-	195.4	0.249
	Poloxamer 188 (5)	-	212.1	0.355
	Polysorbate 40 (5)	-	143.7	0.216
Shea butter	Sorbitan laurate (10)		221.8	0.297
	Polysorbate 40 (66.7)	Sorbitan palmitate (11.8)	386.9	0.693
	Sorbitan laurate (5)		149	0.183
Cetyl palmitate	Polysorbate 65 (10)		252.1	0.244
	Sorbitan sesquiisostearate (10)		342.7	0.398
	Polysorbate 40 (27)	Sorbitan palmitate (15.9)	193.6	0.209
	Polysorbate 40 (13.5)	Sorbitan palmitate (7.9)	176.7	0.165
Candelilla wax	Ceteth 20 (10)		165.8	0.096
Beeswax	Steareth 10 (10)		253.6	0.237

2.5. SLN characterization

2.5.1. Scanning electron microscopy (SEM)

SLNs morphology was determined by SEM analysis using a microscope Hitachi, S800 FEG. SLNs aqueous suspension was dripped onto carbon adhesive robber. Water was removed at 40°C overnight. Then, samples were metalized with 10nm of platinum in an evaporator by cathodic sputtering. The observation was performed with a 25 kV voltage.

2.5.2. Fragrance encapsulation in SLN

First the fragrance total recovery was determined by dissolving 250 µL of SLN suspensions in 5ml of chloroform. After centrifugation (15 min under 7800 rpm), fragrances were extracted from the lipid phase by chloroform at 50°C (5 mL) and quantified by gas chromatography (GC) (total fragrance). The extraction method was validated previously, no fragrance was found in the lipid phase after only one extraction. The fragrance recovery (% recovery) was

calculated by dividing this quantity by the initial fragrance amount introduced in the preparation. In parallel, 400 µL of SLN suspension was centrifuged at 14,000 rpm for 30 min with microfilters of 10 kDa to separate the SLNs from the continuous phase. Supernatant was collected, put in 1mL of chloroform and analyzed by GC to determine the quantity of fragrance which was not encapsulated in the SLNs. Measurements were replicated two times. The fragrance recovery (%recovery) and the encapsulation efficiency (EE%) were calculated respectively by Eq.1 and Eq.2.

$$\% recovery = \left[\frac{\text{weight of fragrance}}{\text{initial weight of fragrance in the preparation}} \right] \times 100 \text{ (Eq.1)}$$

$$\% EE = \left[\frac{\text{weight of fragrance} - \text{weight of fragrance non encapsulated}}{\text{initial weight of fragrance in the preparation}} \right] \times 100 \text{ (Eq.2)}$$

Gas chromatography

Fragrance quantification was performed by GC with flame ionization detector (GC-FID). Analysis was carried out using Shimadzu GC 2010 plus equipped with split/splitless injector and capillary column Equity-5™ (30 m x 0.25 µm, 0.25 µm film thickness) conditioned at 300°C for 30 min before use. The carrier gas was helium (He) at a constant flow rate of 1 mL/min with a pressure of 100 kPa. The FID detector temperature was maintained at 350°C. The sample volume injected was 2 µL. For analysis, the oven temperature was increased from 100°C to 190°C at 2.5°C/min. The total program time was 35 min. Fragrance retention times (min) and quantification limits are collected in Table 5.

Table 5. Fragrance retention times and quantification limits for fragrances components. Slope and intercept of regression line are the average of 3 measurements for each point.

Fragrance name	Retention times (min)	Quantification limits (µg/g in acetone)	Regression slope [UA].g/µg
Geraniol	11..4	0.25	462 (±74)
Cinnamaldehyde	12..3	0.28	533 (±81)
7-hydroxycitronellal	12..7	0.28	406(±81)
Cinnamyl alcohol	13.5	0.28	539(±65)
Eugenol	15.6	0.025	439 (±86)
Isoeugenol	19.7	0.024	392 (±74)
(α)-amylcinnamaldehyde	28.6	0.27	545(±85)

2.5.3. Size distribution and zeta potential

SLN size distribution was determined by photon correlation spectroscopy and zeta potential was measured using an interferometric laser called M3 Phase Analysis Light Scattering- (Zeta Sizer Nano ZS, Malvern Instrument) with SLN suspension diluted in deionized water (pH comprised between 6 and 7) at 25°C. The analysis model was multimodal narrow modes (high resolution) with a display range between 0.6 and 6000 nm with a lower threshold of 0.05 and an upper threshold of 0.01. Results are the average of 3 measurements per sample and 14 runs per measure.

This instrument measured the mean size and the PDI. 20 μ L of SLN suspension were diluted in 2 mL to proceed to the measurement of zeta potential which was calculated by Smoluchowski's equation from the electrophoretic mobility of nanoparticles.

2.5.4. Determination of SLN stability

The chemical stability of SLN suspensions containing fragrance mix was determined by measuring pH and EE% as a function of time and storage conditions. The physical stability was evaluated by size distribution and Zeta potential measurements. Three storage conditions were: 4°C, 25°C and 50°C during 1 month under static conditions. SLNs were stable if insignificant difference was obtained between the initial measurement and the measurement after storage.

2.5.5. Statistical analysis

All samples and experiments were performed in triplicate except the experiments for surfactant screening. Fragrance quantification was repeated two times for each three samples. Results are expressed as Mean \pm Standard Deviation. Analysis of variance (ANOVA) was performed to investigate differences between protocols. Data were considered statistically different for $p < 0.05$. Analyses were performed by GraphPrism software. Correlation regression was obtained with GraphPad Prism and spearman (two-tailed) factor was used. P-value less than 0.01 was considered significant noted *, $P < 0.001$ noted ** and $P < 0.001$ noted ***.

3. RESULTS

In this study, SLNs were prepared with a process in three steps including emulsification, sonication and cooling. Process was performed above the melting temperature of the lipids. This process was optimized step by step, by studying a single parameter at a time.

3.1. SLN formulation

3.1.1. Lipid characterization

All lipids presented a non –Newtonian behavior, the majority of them behaved as shear thinning fluids and their viscosity decreased while increasing the shear rate. Shearing them resulted in disentangling the conformation of macromolecules in order to put them in the flow direction. This reorganization reflects a decrease in viscosity which appeared more or less quickly according to the lipid nature and the interactions within macromolecules. Only candelilla behaved as a shear thickening fluid. Viscosity can be correlated with the structure and high viscosity reflects a strong interaction in the structure of the materials. Lipids may therefore be classified in terms of decreasing viscosity as follows: shea butter, candelilla, C10-18 triglycerides, petrolatum, cetyl palmitate, and beeswax (Figure 2)

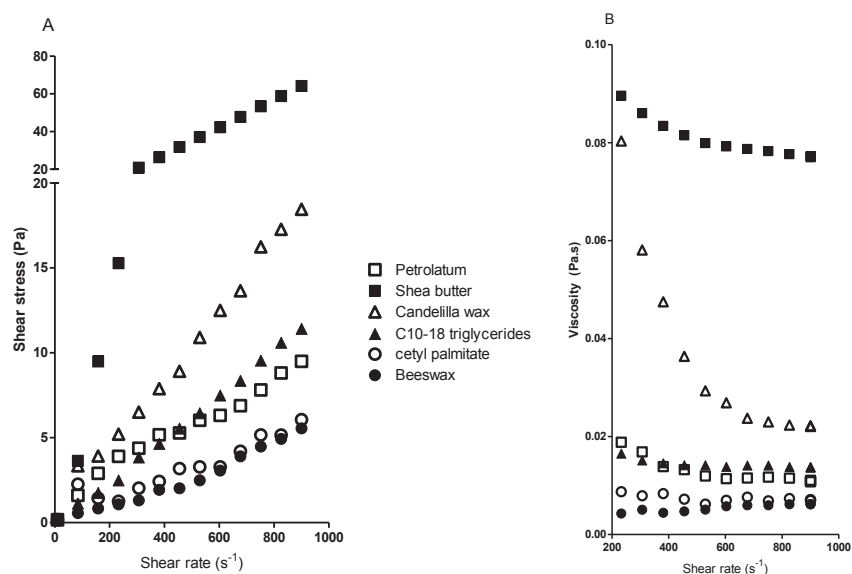


Figure 2. Rheological characterization of lipids. A- Shear stress as a function of the shear rate. B- Viscosity as a function of shear rate for all lipids at their melting temperature. Closed circles represent beeswax, unclosed circles cetyl palmitate, closed triangles C10-18 triglycerides, unclosed triangles candelilla, closed squares shea butter and unclosed squares petrolatum.

3.1.2. Petrolatum SLN development

A standard emulsion was prepared with petrolatum (20%), surfactant (2%) and deionized water (78%). Emulsification stirring rate and duration were fixed at 24,000 rpm and 300 s for the surfactant screening. The objective was to develop macroscopically stable and homogeneous preparation (without aggregated particles). Nonionic surfactants were chosen and the amount of each one was calculated to match the petrolatum HLB_R (12±1)^[28]. Couples of hydrophilic and lipophilic surfactants were tested (Table 4). This screening allowed us to determine an optimal condition to obtain SLNs with an adequate size distribution (mean size below 200 nm and PDI less than 0.25). This result was achieved by using polysorbate 40 (1.19%) associated with sorbitan palmitate (0.81%). Furthermore this SLN suspension was stable for at least 7 days.

This first part of the study allowed defining the surfactant couple. Then, the influence of petrolatum and total surfactant amounts on the size distribution was determined. Results are shown on Figure 3. No significant difference was measured whatever petrolatum amount in the concentration range studied (from 5 to 20% w/w). So petrolatum amount was fixed at 5% (w/w) in order to decrease the viscosity of the preparation and to facilitate the successive steps of the protocol.

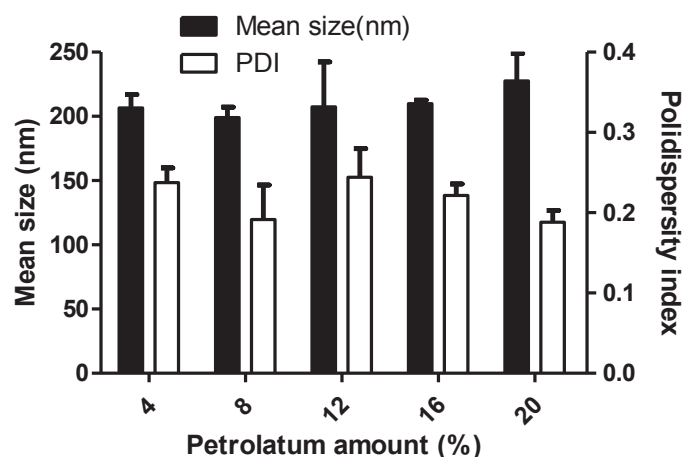


Figure 3. Mean size (nm, colorless bars) and PDI (black bars) of SLNs obtained with several petrolatum amounts ($n=3$). Ratio of petrolatum to surfactant was fixed at 10. Surfactants were polysorbate 40 and sorbitan palmitate. Emulsification under 24,000 rpm for 300 s and sonication under 200 W for 1 min. P-value less than 0.05 was considered significant.

The study of the process parameters was then carried out with the formulation parameters (oil quantity and surfactant) chosen before. The increase of emulsification duration and stirring rate engendered a decrease of the droplet size (Figure 4). However, the mean particle size reached a limit minimal value which could not be overcome even by increasing the stirring duration. This minimal value depended on the stirring rate. It was achieved after 300 s for a stirring rate of 24,000 rpm, 1800 s for 22,000 rpm and 3600 s for 19,000 rpm. The lower emulsification time was chosen, *i.e.* 300 s at 24,000 rpm. With these conditions a mono-disperse size distribution of droplets was obtained with a mean size close to 2 μm .

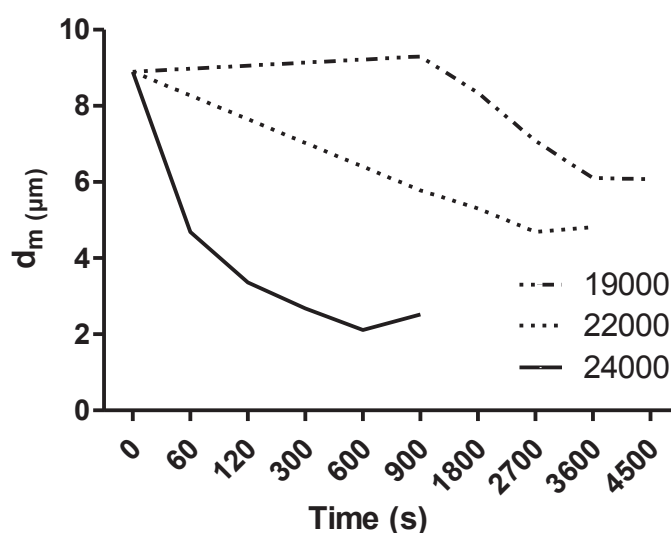


Figure 4. Mean size (μm) of droplets obtained for different stirring rates as a function of stirring time. Emulsions were composed of 5% of petrolatum, 0.30% polysorbate 80 and 0.20% sorbitan palmitate. Continuous line represented 24,000 rpm, pointed line 22,000 rpm and dashed line 19,000 rpm.

Then, ultrasounds were applied to the emulsion to decrease the mean droplet size. This step was controlled by two parameters, sonication power and time (Figure 5A and 5B). The influence of the power was measured for a sonication time of 60 s. Two conditions allowed preparing SLNs with a mean size close to 200 nm and a low PDI (0.25): 200 W and 300 W. No significant difference between these two conditions was recorded. The lowest power (200 W) was selected to minimize the emulsion temperature increase. The influence of the time was evaluated at 200 W. Results are presented on Figure 5B. The optimal results were obtained for 60 s duration. The maximum duration was 90 s, above this value, a destabilization of the system was observed.

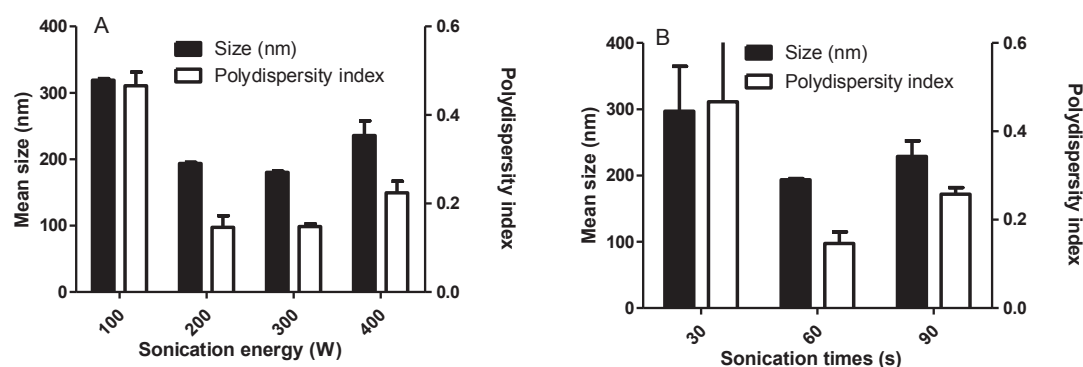


Figure 5. Mean size (nm, colorless bars) and PDI (black bars) of SLNs obtained with different sonication power and time (n=3). Emulsions were composed of 5% of petrolatum, 0.30% polysorbate 80 and 0.20% sorbitan palmitate. A - Sonication power variation from 100 W to 400 W during 60 s. B- Sonication time variation between 30s and 90s with power fixed at 200 W.

Petrolatum SLNs were prepared with the optimized protocol; 5% petrolatum, 0.3% polysorbate 40, 0.2% sorbitan palmitate and 94.5% deionized water were warmed up to 70°C. The emulsion was stirred for 300 s under 24,000 rpm at 70°C and then homogenized with sonication during 60 s under 200 W. SLNs presented a mean size of 195 nm and a PDI 0.149 with a spherical shape (Figure 6).

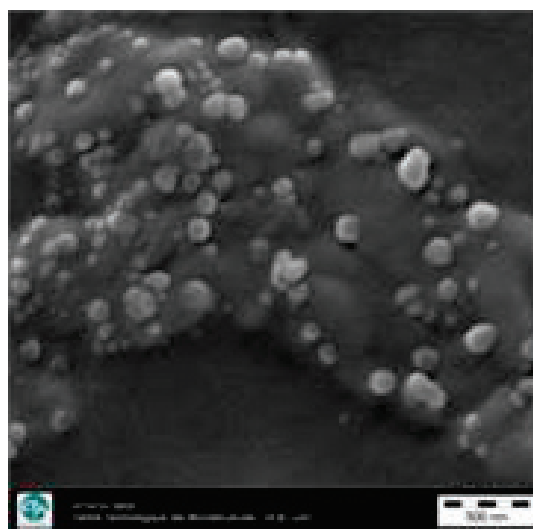


Figure 6. Scanning electron microscopy image of petrolatum SLNs (80000X of magnitude). Scale bar represents 500 nm.

3.1.3. Preparation of SLNs with the optimal protocol

3.1.3.1. Surfactant screening

Standard protocol of emulsification combined with sonication allowed obtaining droplets with monodisperse size distribution for each emulsion composition. Five other lipids were tested, candelilla, petrolatum, beeswax, cetyl palmitate and C10-18 triglycerides. Results are described in Table 4. Acceptance criteria were a mean size below 200 nm and a PDI close to 0.25. This was achieved with C10-18 triglycerides and 0.5% polysorbate 40; SLNs obtained had a mean size of 143 nm and the PDI was 0.216. A mix of 0.37% polysorbate 40 and 0.63% sorbitan palmitate was used to prepare cetyl palmitate SLNs with a mean size of 177 nm and a PDI 0.165. Shea butter SLN obtaining did not require the sonication step, as a nanoemulsion was realized with 1% sorbitan laurate directly after the emulsification step. The mean size and PDI of shea butter SLNs were respectively 149 nm and 0.183. Candelilla and beeswax allowed obtaining SLNs with a mean size slightly higher than 200 nm, but the PDI was within the criteria. Candelilla SLNs were obtained with ceteth 20 (0.5%) the mean size was 254 nm and the PDI 0.096. Beeswax SLNs with a mean size of 254 nm and a PDI of 0.237 were prepared with 1% steareth 10.

3.1.3.2. Influence of the sonication step

Sonication process was controlled by two parameters, the time and the power of sonication. Optimal conditions were determined for each lipid (Figure 7 and Table 6). Sonication allowed reducing the mean size and the size distribution with all lipids except the beeswax. In that case the best results were a mean size of 254 nm and a PDI of 0.247. They were obtained by applying a sonication power of 200 W during 60 s. These SLNs did not correspond to our criteria (a mean size below 200 nm and a PDI inferior to 0.25) so they were discarded.

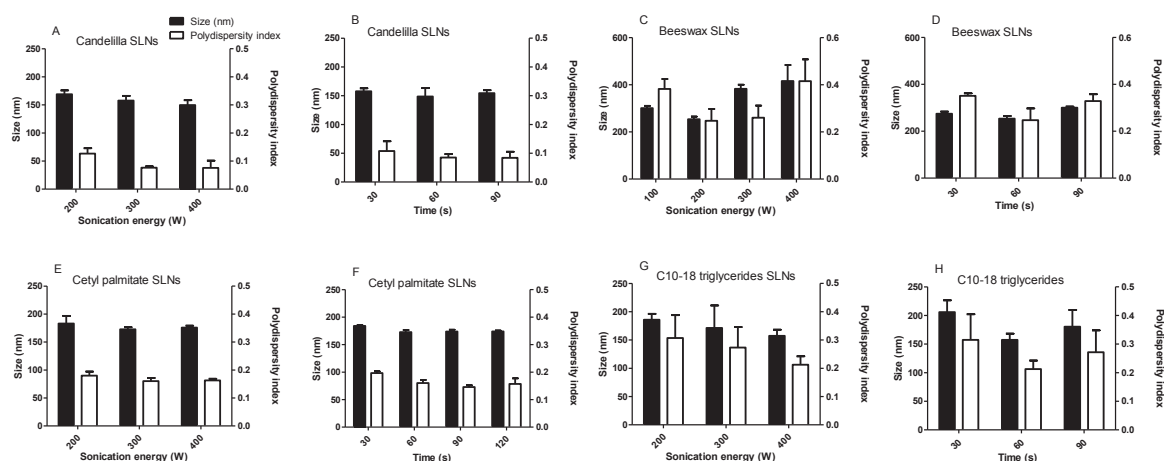


Figure 7. Sonication process optimization. SLNs were prepared with 5% of lipids, 0.5% or 1% of surfactants. Oil in water emulsions were prepared at 70°C under 24000rpm for 300s. These results are the average of three measurements for three samples. Colorless bars represent PDI and black bars the mean size of SLNs. A, C, E, G: influence of ultrasounds power on the mean size and PDI of SLNs based on candelilla (A), beeswax (C), cetyl palmitate (E), C10-18 triglycerides (G). B, D, F, H : influence of the time of sonication on the mean size and PDI of SLNs based on candelilla (B), beeswax (D), cetyl palmitate (F), C10-18 triglycerides (H).

Table 6. Sonication process optimization of SLNs prepared with 5% of lipids, 0.5% or 1% of surfactants. Oil in water emulsions were prepared at 70°C under 24000 rpm for 300 s. Mean size and size distribution parameter (PDI)

Lipid name	Sonication power (W)	Sonication duration (s)	Mean size (nm)	PDI
Candelilla	300	60	148.6 (± 14.7)	0.085 (± 0.012)
Beeswax	200	60	253.7 (± 11.4)	0.247 (± 0.050)
Cetyl palmitate	300	90	173.8 (± 3.2)	0.146 (± 0.007)
C10-18 triglycerides	400	60	157.3 (± 10.9)	0.213 (± 0.030)

3.1.3.3. Fragrance encapsulation in SLNs

Candelilla SLNs, petrolatum SLNs, C10-18 triglycerides SLNs, cetyl palmitate SLNs, beeswax SLNs and shea butter SLNs loaded with fragrance mix were prepared with the optimal protocol. Fragrance mix was added in the preparation at 0.5% (w/w) before the emulsion step. The properties of SLNs are summarized in table 7. SLNs presented a mean size comprised between 110 nm and 195 nm with PDI below 0.25, SLN zeta potential was negative and comprised between -10 mV and -30 mV (Table 7). The pH was closed to 5.0 (Table 7). As previously observed when preparing beeswax SLNs without any fragrance inside, SLNs had a too high mean size and PDI and they were not further considered. The global encapsulation efficiency EE% ranged from 66.4% (petrolatum) to 94.9% (cetyl palmitate). The recovery% and the encapsulation efficiency of each constituents of fragrance mix are given in Table 8 and Figure 8 respectively.

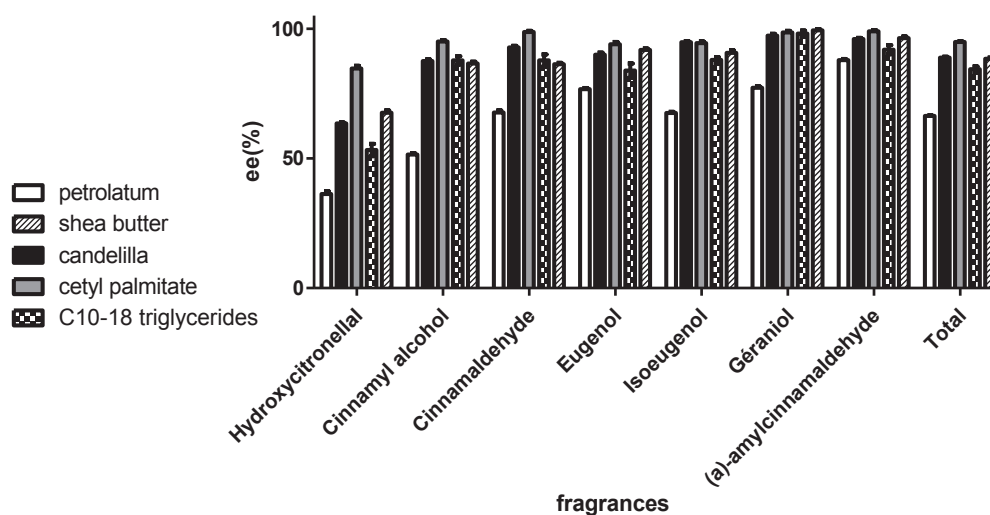


Figure 8. Fragrance encapsulation efficiency of SLNs. Results are the average of three measurements on three samples. Colorless bars: petrolatum SLNs, black bars: candelilla SLNs, grey bars: cetyl palmitate SLNs, dotted bars: C10-18 triglycerides SLNs and hatched bars: shea butter SLNs

For all lipids and fragrances, the total recovery was higher than 65% (Table 8), the lowest recovery% was for cinnamaldehyde encapsulated into candelilla SLNs (45.6% (± 3.1)) and the highest recovery% was with 7-hydroxycitronellal into shea butter SLNs. Whatever the lipid used, the encapsulation efficiency (EE%) was proportional to the partition coefficient (log P) of the fragrances. Petrolatum resulted in the lowest encapsulation efficiencies, values ranged from 36.3% (± 2.5) for hydroxycitronellal to 87.9% (± 1.1) for α -amylcinnamaldehyde (Figure 8). On the contrary, the highest EE% were obtained with cetyl palmitate, EE% ranged from 84.6% (± 2.5) for hydroxycitronellal to 99.0% (± 0.5) for α -amylcinnamaldehyde.

Table 7. Properties of fragrance mix loaded SLNs

Lipids	Lipid viscosity (at 400s ⁻¹ shear rate) mPa.s	Lipid melting point (°C)	Sonication power (W)	Sonication duration (s)	Mean size (nm)	PDI	pH	Zeta potential	Total fragrance mix EE%
Candelilla	47.5	70	300	60	149.7 (± 8.7)	0.076 (± 0.026)	5.3	-26.9 (± 1.6)	88.9 (± 0.8)
Petrolatum	13.9	37	200	60	192.3 (± 9.7)	0.185 (± 0.014)	5.0	-29.4 (± 2.3)	66.4 (± 0.5)
Cetyl palmitate	8.4	50	300	90	173.9 (± 3.2)	0.148 (± 0.007)	5.3	-28.5 (± 2.8)	94.9 (± 0.5)
Shea butter	83.4	35	-	-	141.3 (± 6.0)	0.202 (± 0.009)	5.0	-16.8 (± 1.7)	88.4 (± 1.0)
C10-18 triglycerides	14.6	35	400	60	157.3 (± 10.9)	0.213 (± 0.030)	5.3	-- 12.8(± 5.2)	84.4 (± 1.1)

Table 8. Fragrance properties and their recovery after encapsulation within SLNs

Fragrances	Partition coefficient log P ^a	Petrolatum SLNs	Candelilla SLNs	Cetyl palmitate SLNs	C10-18 triglycerides SLNs	Shea butter SLNs
Hydroxycitronellal	1.65	88.4 (± 2.6)	67.9(± 4.5)	95.1(± 2.9)	73.7 (± 2.6)	100 (± 4.8)
Cinnamyl alcohol	1.70	92.8 (± 1.8)	69.5(± 1.6)	85.1(± 3.7)	75.4 (± 3.5)	100 (± 6.3)
Cinnamaldehyde	2.12	83.8(± 3.1)	68.4(± 2.3)	80.3(± 4.3)	75.6 (± 4.2)	94.2 (± 5.2)
Eugenol	2.20	87.3 (± 0.9)	68.2(± 2.6)	83.0(± 2.6)	70.2 (± 3.7)	94.9 (± 3.9)
Isoeugenol	2.45	74.4(± 2.5)	67.5(± 3.6)	79.4(± 3.8)	84.6 (± 5.2)	85.9(± 2.7)
Geraniol	3.28	59.6 (± 1.5)	49.5(± 2.1)	45.6(± 3.1)	53.0 (± 2.6)	51.7 (± 3.2)
α -amylcinnamal	4.80	68.0 (± 2.9)	64.6(± 2.9)	84.5(± 2.2)	98.2 (± 3.7)	53.3 (± 4.2)
Total	-	77.8 (± 12.7)	65.1 (± 7.0)	79 (± 15.0)	75.8 (± 13.6)	82.9 (± 21.2)

^aPartition coefficients were calculated with ACD/PhysChem software.

3.1.4. Stability of SLNs loaded with Fragrance mix

Stability was evaluated during 1 month storage under three temperatures (4°C, 25°C and 50°C). Stability of SLN suspensions was evaluated by measuring pH, zeta potential, size and PDI during storage. Mean size and PDI increase could be the result of aggregates formation and so a loss of SLN stability. Results are shown in Figure 9. pH was constant during 1 month whatever the storage condition despite no preservative was added in the preparations. Zeta potential was negative for all SLNs and values were stable with time. Cetyl palmitate and petrolatum SLNs were stable in terms of size distribution during 1month whatever the storage temperature. Stability of candelilla SLNs was achieved for one month at 4°C and 25°C, only for 15 days at 50°C. C10-18 triglycerides SLN were only stable during 21 days at 25°C and 50°C, but instability was recorded at 4°C after the preparation. Sea butter SLNs were not stable at all. This was confirmed by visual observations (Figure 9).

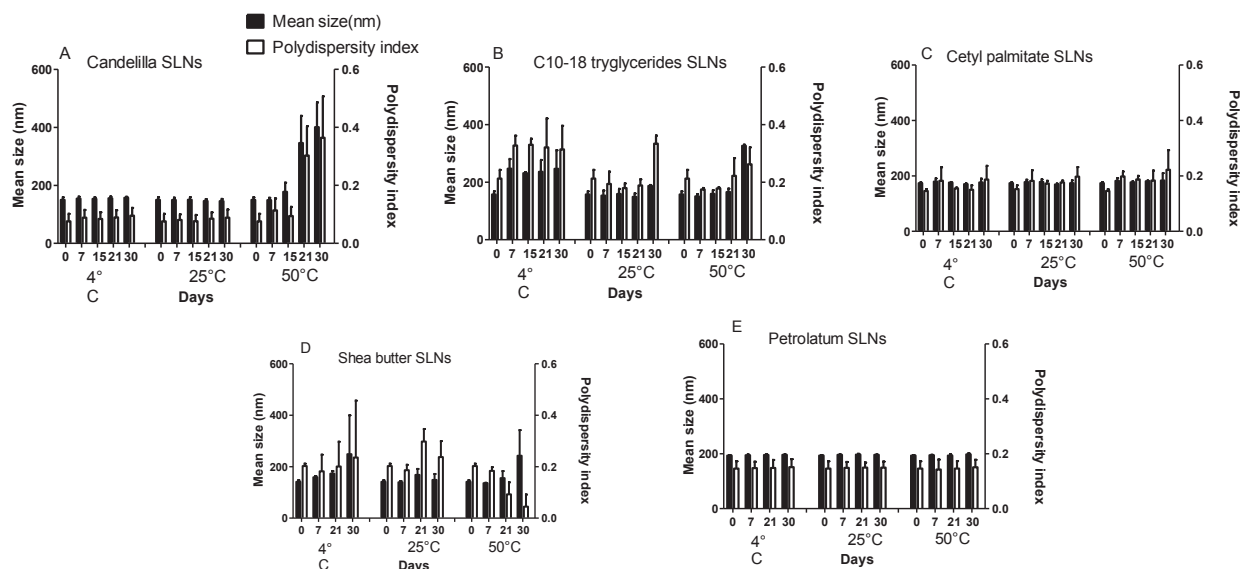


Figure 9. Fragrance mix SLN stability. Storage at 4°C, 25°C, 50°C. These results are the average of three measurements for three samples. Colorless bars represent SLN mean size and black bars represent PDI.

Considering the previous results, the study of encapsulation stability was carried out only with stable SLNs. Petrolatum SLNs, cetyl palmitate SLNs, candelilla SLNs were stable during 1 month and presented fragrance encapsulation efficiencies higher than 80% for cetyl palmitate SLN, comprised between 35% and 95% for petrolatum SLN, and higher than 60% for candelilla. No fragrance release was recorded (Figure 10).

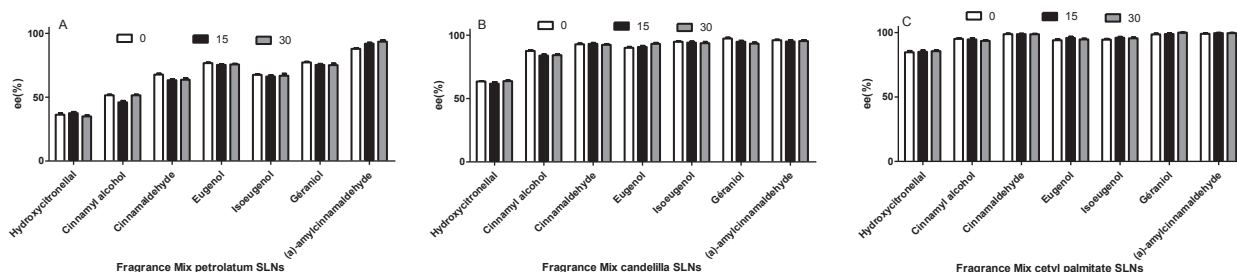


Figure 10. Encapsulation efficiency in SLNs during storage at 25°C for 30 days. A – petrolatum SLNs , B – candelilla SLNs and C- cetyl palmitate. Results are the average of three measurements for three samples. Colorless bars represent initial EE%, black bars EE% after 15 days, and grey bars EE% after 1 month.

4. DISCUSSION

We chose to prepare biodegradable SLNs loaded with a mix of fragrances. SLNs should have a low mean size (below 200 nm) and a narrow size distribution ($PDI < 0.25$). Encapsulation of fragrances in nanoparticles is commonly used to improve their stability^[30] and provide a sustained release^[4]. Many colloidal systems are available, each of them presenting advantages and disadvantages and the choice depends on the final application. Polymeric nanoparticles are prepared with natural or synthetic polymers, by simple processes^[31], and it is possible to modify the chemical structure of the polymer to improve the drug encapsulation^[32]. However, the toxicity of these structures constitutes the main disadvantage; this toxicity depends on the polymer and the presence of organic solvent residues in the nanoparticle structure^[33]. Furthermore, most production processes lead to the preparation of low amount of particles

due to low concentration required during the process ^[31, 34]. In term of stability, polymer hydrolysis is usually observed and a step of freeze drying is required to prevent polymer degradation^[34]. Liposomes are considered as a significant alternative in drug delivery, allowing the encapsulation of hydrophobic and hydrophilic drugs ^[35]. The structure of liposomes is adapted for the controlled release of the drug and to decrease the toxicological hazards^[36]. However, liposomes present a low chemical and physical stability, aggregation and drug degradation are observed during storage. SLNs combine the advantages of the other particle types including the control of drug release and drug targeting but avoid the disadvantages, especially those lined to the toxicity. SLNs present high drug payloads, no organic solvent residues, low or no biotoxicity, and they can incorporate lipophilic and hydrophobic drugs. The production is simple and large scale production and sterilization are easily achieved^[17].

In our study, SLNs were prepared by a hot homogenization process with three successive steps, first an oil in water mono-disperse coarse emulsion was prepared with a rotor-stator stirring, then ultrasonication allowed decreasing the mean size and this nanoemulsion was cooled down to form SLNs dispersed in water. The main advantage of this process lies in the absence of any solvent, reducing toxicological hazards found with other processes such as solvent displacement. Furthermore, all steps were very easy to handle^[37].

4.1. Development of Petrolatum SLNs and process optimization

First, the process was optimized for the development of petrolatum SLNs. A standard emulsion composed of petrolatum (20%), surfactant (2%) and deionized water (78%) was prepared for the screening of surfactants^[38,39] Emulsion was stabilized with a couple of surfactants, one hydrophilic and one hydrophobic, the concentration of each of them was adjusted to match the HLB_R of petrolatum^[29]. Nonionic surfactants classically used for this type of emulsion were tested, polyoxyethylene 20 sorbitan ester, sorbitan ester^[38], polyoxyethylene glycol alkyl ethers^[40] and polyoxyethylene-propylene oxide blocks copolymer^[41], and two non-conventional surfactants with an HLB close to HLB_R for petrolatum. The other process parameters (stirring rate, ultrasounds power and duration of each step) were kept constant. In these conditions, the best results were obtained with the couple of sorbitan esters; polysorbate 40 (1.19%) and sorbitan palmitate (0.81%). Petrolatum SLNs showed adequate size distribution and their stability was ensured for at least seven days. Gullapalli *et al.* also used sorbitan esters to stabilize mineral oil emulsion (polysorbate 80 and sorbitan palmitate). In their study, a screening of 9 couples of surfactants were performed, including polysorbate 80 and sorbitan oleate, polysorbate 80 and sorbitan palmitate, polysorbate 80 and sorbitan laurate, polysorbate 40 and sorbitan palmitate, polysorbate 40 and sorbitan laurate, polysorbate 20 and sorbitan oleate, polysorbate 20 and sorbitan palmitate, polysorbate 20 and sorbitan laurate. They observed a creaming of all emulsions after 96 hours except for the couple polysorbate 80 and sorbitan palmitate^[39]. In our study, the emulsion stability was not a requirement, as the emulsion is turned into solid nanoparticles immediately after its preparation. The size distribution and the stability are evaluated on the final SLN suspension and this could explain the difference with the results of Gullapalli *et al.* Petrowski (1976) explained that the emulsion stabilization required that the

length of the hydrocarbon chains of the oil phase and that of the surfactants must be similar and it correlated with our results^[41].

Secondly, the influence of petrolatum amount on the mean size of SLNs was evaluated and no effect was observed in the concentration range studied (4%-20%). Leong *et al.* also studied the effect of sunflower oil amount on mean droplet diameter of nanoemulsion stabilized with 10 wt% of surfactant (couple polysorbate 80/sorbitan oleate). They observed that reducing the amount of oil from 16% wt% to 2.5%wt led to decrease the mean size of droplets from 150 nm to 40 nm^[43]. However, their experiments were carried out with 10 wt% surfactant and the optimal amount of oil was four times lower than that of surfactant. With such a large excess of surfactant, they found equilibrium when the oil amount reached 10%. In our study, the amount of oil was fixed to the lower value, 4%. This low concentration was sufficient to stabilize our preparation.

In a third part, the stirring rate and duration of the emulsification step was studied. This step of emulsification is crucial for the process following, and the final size distribution. Menhert and Mäder reported that the size of emulsion affected the final SLNs, and it was necessary to prepare an emulsion with monodisperse size of few micrometers to obtain SLNs with a narrow size distribution^[17]. As expected, the mean diameter of droplets decreased with the stirring rate increase whatever the stirring rate. The mean diameter decreased when increasing the stirring time until reaching a plateau after a critical time depending on the stirring rate according Leong *et al.*^[43]. This critical time decreased when the stirring rate increased, it was only 300 s for the highest stirring rate (24,000 rpm) compared to 2700 s (20,000 rpm) and 3600s (19,000 rpm). Sandri *et al.* also studied the preparation of cyclosporine loaded into chitosan and Compritol 888 ATO SLNs and their preparation process was similar to our emulsion parameters (24,000 rpm during 300 s)^[44]. Ahlin P *et al.* investigated the effect of emulsification time and stirring rate on the mean particle size of SLNs prepared with many types of lipids by emulsion-sonication process^[20]. Results showed that increasing the stirring rate did not significantly change the particle size, but slightly improved the PDI. No general condition could be established for all the lipids studied.

The effect of the ultrasound process parameters was then studied. This step also plays an important role to control the final size distribution of SLNs^[45]. Sonication is a well-known process to obtain nanometric sizes (100 – 400 nm) with a narrow size distribution; it is recognized as simple and reproducible. Two factors were studied: the ultrasound power and the duration influencing the mean size and the PDI of SLNs. For a constant duration, the mean size decreased while increasing the power from 100 W to 200 W. Higher ultrasound power did not improve the size distribution. On the contrary, a power of 400 W resulted in an increase of the mean size probably due to a temperature increase in the medium. Abbas S *et al.* showed similar results for the preparation of octenyl succinic anhydride starch SLNs and observed a decrease of the mean size of SLNs for sonication power comprised between 120 W (mean size of 230 nm) and 360 W (mean size of 200 nm) and an equilibrium plateau for higher power of sonication (> 360 W)^[46]. We chose to fix this power to an optimal value of 200 W. The ultrasound power being fixed at 200 W to observe the influence of the duration, an increase of this time from 30 s to 60 s resulted in a decrease of the mean size. However,

extending this duration did not improve the size distribution and the mean size increased again after 90 s and a destabilization of the emulsion was observed, also probably due to the temperature increase. Furthermore, impurities providing from the probe were observed in the medium for longer durations. This contamination of the medium was already observed by other authors but they appeared later, after 15 min at least^[47]. Optimal time was fixed to 60 s. Abbas S *et al.* observed a mean size decrease with the increase of sonication duration until 300 s and a plateau was recorded for longer time^[46]. Finally, SLNs obtained with the optimized process presented a spherical shape. This result is in accordance with the literature, Singh *et al.* and Dudhipala and Veerabrahma, also obtained spherical SLNs using a similar process with respectively tristearin and triglycerides (Dynasan 116) as lipid materials^[48,49].

4.2. Development of SLNs with the optimized protocol

Our optimized protocol was applied to develop five SLNs based on candelilla, beeswax, cetyl palmitate, C10-18 triglycerides, and shea butter. Candelilla and beeswax have similar composition including hydrocarbons, free fatty acid esters, and free fatty alcohols, petrolatum is only made of hydrocarbons, cetyl palmitate contains saturated fatty acids and free alcohols, shea butter fatty acids and C10-18 triglycerides only triglycerides. Candelilla, beeswax, cetyl palmitate, C10-18 triglycerides, and shea butter melting points are respectively 70, 62, 50, 35 and 35°C (Table 7). These lipids revealed a non-Newtonian behavior and they can be ranked by decreasing viscosity: shea butter, candelilla, C10-18 triglycerides, petrolatum, cetyl palmitate and beeswax.

Emulsifiers were tested for each lipid to obtain SLNs with adequate properties. The choice of surfactant nature and concentrations had a strong effect on the SLNs properties^[22, 50]. The surfactant couple had to be adjusted in each case to match the HLB_r of the lipids ranging from 8 (shea butter) to 16 (triglycerides). The parameters of the emulsion step were fixed at 24,000 rpm (400 s⁻¹) for 300 s and monodisperse emulsions with droplets of few micrometers were obtained. Then, the ultrasound step was studied for each lipid and the conditions were adapted. No correlation was found between physical properties of lipids (viscosity and melting temperature) and the ultrasound energy required to get nanometric size (Table 8).

4.2.1. Fragrances loaded into SLN

SLNs loaded with 0.5% (w/w) of fragrance mix were prepared according to the optimized protocol. SLN properties are given in Table 9. Five lipids allowed preparing fragrances nanoparticles with a narrow size distribution (140 -195 nm). Beeswax SLNs presented a size above 200 nm with high PDI so the EE% was not measured for this preparation. A correlation was established between the mean size of SLNs and the lipid viscosity, size was inversely proportional to the viscosity with $r_{\text{spearman}} = -0.9429$ and a P value <0.01 or **. This result is not in accordance with Jahnke who showed that the average particle size of SLNs increased with the viscosity of the dispersed phase (ranged 50 to 300 mPa.s)^[24], in our study, the viscosity of the dispersed phase was comprised between 8.4 and 83.4mPa.s and it could be explained this difference of results.

Furthermore, Menhert and Mäder showed that the composition of the lipid phase might have a considerable effect on the mean size and zeta potential of SLNs^[17]. This composition

influences directly the crystallization step during cooling. Ahlin *et al.* obtained Witepsol®W35 SLNs significantly smaller (117.0 (± 1.8) nm) than Dynasan®118 SLNs (175.1 (± 3.5) nm). They explained this result by the fact that Witepsol®W35 contains shorter fatty acid chains and considerable amounts of mono- and diglycerides which possess surface active properties^[20]. Similar results were obtained in our study. Beeswax (Table 7) having the longest carbon chain (C₄₈) led to SLNs with a higher mean size (257.4 (± 4.3) nm). In the other lipids the carbon chain length is quite similar and the mean sizes were closed.

The total fragrance recovery% was calculated as the average recovery of the seven molecules contained in the fragrance mix. For petrolatum SLNs, candelilla SLNs, cetyl palmitate SLNs, C10-18 triglycerides SLNs and shea butter SLNs, its value was respectively 77.8% (± 12.7), 65.1% (± 7.0), 79% (± 15.0), 75.8% (± 13.6) and 82.9% (± 21.2)%. Shea butter SLNs presented the highest yield. This should be related to the process that needed only the step of emulsification without any ultrasounds to produce directly nanoparticles with this lipid. So the risk of fragrance lost by evaporation was reduced. The recovery was different from one molecule to another, without any correlation with their physicochemical properties and especially temperature and enthalpy of vaporization. The recovery also varied with the type of SLNs, the same fragrance resulted in different recovery depending on the lipid used. This could be related to the process conditions which was adapted for each lipid.

The global EE% was calculated as the average of EE% for each molecule. The results ranged between 66.5% (± 0.5) for petrolatum SLNs and 94.9% (± 0.5) for cetyl palmitate. No correlation between the viscosity of the lipid phase or the melting temperature and the total EE% could be determined with respectively $r_{\text{spearman}} = -0.1$ (P value = 0.48) and $r_{\text{spearman}} = 0.56$ (P value = 0.35), so the encapsulation into SLNs did not depend on the physical properties of lipids. Souto *et al.* showed that the EE% and the release rate of fragrance encapsulated were linked to the lipid crystallinity^[51]. However, the small size of these particles and the presence of surfactant influenced and delayed the lipid crystallization, and it can take a long time to reach the equilibrium state. This might explain a low stability of SLNs observed in some studies^[47]. Singh *et al.* showed that the EE% greatly increased when the lipid was a mix compared as a pure compound. The encapsulation of cefuroxime axetil in stearic acid SLNs was closed to 20%, whereas in stearic acid tristearin mix (50:50) SLNs, EE% was 65%^[48]. In our study, all the lipids were composed of several ingredients and this could explain the high EE% observed. Lowest EE% was obtained with petrolatum SLNs 66.4% (± 0.5), then ranged by increasing values: C10-18 triglycerides 84.4% (± 1.1), shea butter 88.4% (± 1.0), candelilla 88.9% (± 0.8), cetyl palmitate 94.9% (± 0.5). The differences could be explained by the different type of interaction between fragrances and lipids. As described by Lukowski *et al.*, molecules incorporation inside SLNs could be represented by three models: (i) homogenous matrix and solid solution: in that case, molecules are dispersed homogeneously in the lipid matrix, (ii) drug-enriched shell, molecules are concentrated in the outer shell of nanoparticles, and (iii) drug enriched core of nanoparticles, molecules are concentrated in the core of nanoparticles. The formation of drug-enriched shell is explained by two phenomena. During the emulsification step, molecules to be encapsulated are located in the oil droplets; the cooling step causes the solidification of these droplets^[52]. The rate of solidification of the

lipids depends on their structure and properties and a heterogeneous solid structure could be obtained especially when these lipids are composed of a mix.

The fragrance molecules are trapped during cooling inside the SLNs, according to their affinity with the components of the lipid matrix they will be distributed more or less homogeneously.

The encapsulation of a mixture of seven molecules into SLNs was performed with high global efficiency. Analysis of EE% of each molecule showed differences according to the molecule and the lipid nature. Correlations of EE% and the partition coefficient log P of the molecule were obtained with 4 types of SLNs: C10-18 triglycerides SLNs ($r_{\text{spearman}} = 0.857$ and a P value = 0.012 or *), shea butter SLNs ($r_{\text{spearman}} = 0.893$ and a P value = 0.006 or **), petrolatum SLNs ($r_{\text{spearman}} = 0.893$ and a P value = 0.006 or **), and candelilla SLNs ($r_{\text{spearman}} = 0.9286$ and a P value = 0.003 or **). EE% increased with the molecule log P, except for cetyl palmitate SLNs. In that case, EE% was very high for each molecule encapsulated. Our results showed that the correlation between the log P of the molecule and its EE% was also linked to the total encapsulation, the r_{spearman} increasing with total encapsulation. Nii and Ishii established a similar relationship between EE% of drugs in liposomes and their log P, EE% increasing with log P^[53]. Considering these results, log P seemed to be a good indicator to predict the EE% in SLNs for the majority of lipids except cetyl palmitate. In our study, an encapsulation of a mix of fragrance was achieved. Few data are reported in the literature concerning mixture encapsulation, only encapsulation of essential oil into particles is described, Pena *et al.* studied polysulfone microcapsules loaded with vanillin, but the EE% was determined with only one molecule considered as a tracer^[54]. Li *et al.* prepared chitosan microparticles encapsulating orange oil, and also calculated the EE% with one major component of the mix. It is the first time that encapsulation of a mix of seven molecules in SLNs is reported. Furthermore, the recovery and EE% of each molecule was measured, resulting in a good knowledge on the SLN composition^[4].

The stability was evaluated for each SLN during one month. NP suspension stability was achieved by studying the evolution of several parameters such as pH, zeta potential, size and PDI during storage under three conditions (4°C, 25°C and 50°C). All SLNs had a negative zeta potential comprised between -10 and -30mV. Freitas and Müller showed a high SLN stability for a value of -30 mV that was enough to ensure the suspension stabilization^[55]. Our formulations could be stabilized for longer time by adding a freeze drying step. Transformation into a solid form will indeed prevent Ostwald ripening and avoid hydrolysis reactions^[17].

Shea butter SLNs were not stable with time whatever the storage temperature and it might be explained by the fact that many structures could be presented in the preparation in addition to SLNs such as nanoemulsions which could provide instability^[56]. Their instability could be also provided by the cooling step causing particle size enlargement through gelation of the dispersion^[55]. Gelation phenomenon is largely described with SLNs consisting to the rapid transformation of low-viscosity SLN dispersion into a viscous gel. Freitas and Müller, showed

with Compritol® SLNs that this phenomenon was due to the crystallization of several polymorphic forms of the lipids (stable and unstable forms).

The temperature, the shear and the light could induce the transformation of unstable form accompanied by gel formation^[57]. Siekmann and Westesen also indicated that the particle size increased because of an inadequate amount of surfactant, not sufficient to cover the particle surface. In our study, C10-18 triglycerides SLN were stable only during 21 days at 25°C and 50°C, but gelation was recorded at 4°C. However, no fragrance release from the SLNs was measured, even with those who showed physical instability and size changes^[58].

5. CONCLUSIONS

SLNs loaded with a fragrance mix were prepared by a two steps process, a first hot homogenization followed by ultrasonication before cooling. Five different lipids were used as matrix compounds. The aim of this work was first to optimize the process with one lipid, petrolatum, in order to prepare SLNs with a low size (less than 200 nm), a narrow size distribution (PDI below 0.25) and a high encapsulation efficiency (higher than 50%), then to study the feasibility of this process with other lipids for fragrance mix encapsulation.

This two steps process allowed obtaining low size SLNs, the first step of high shear homogenization leading to the formation of a coarse emulsion in the micrometer range, the ultrasounds allowing to decrease the particles size under 200 nm. SLN size distribution was mainly influenced by the energy provided in the system during the sonication step, through the parameters ultrasound power and time. This protocol was successfully applied to other lipids, candelilla, shea butter, beeswax, C10-18 triglycerides, and cetyl palmitate. Formulation and process parameters had to be adjusted to the lipid nature. A couple of non-ionic surfactants was used to stabilize the dispersion, they were chosen in order to match the HLB of each molten lipid. The sonication parameters varied for each lipid, they were adjusted to get SLNs with the required size distribution. With beeswax it was impossible to reach SLN with a mean size lower than 200 nm.

Fragrance mix was encapsulated into SLNs, the seven molecules were entrapped with a high encapsulation efficiency. The loading ability of SLNs depended on the molecule lipophilicity and on the lipid nature. A correlation between the partition coefficient of the molecules and their encapsulation efficiency was established for all lipids except cetyl palmitate. This encapsulation was stable for at least 1 month, as no fragrance release was measured. The SLNs stability was related to the lipid nature. Cetyl palmitate, candelilla and petrolatum SLNs were stable for at least one month at 4°C and 25°C. These fragrances loaded SLNs could be considered as very suitable carriers for cosmetic products due to their sustained release properties or for the diagnosis of fragrance allergy to optimize patch-test formulation.

6. AKNOWLEDGES

We thank the “Centre technologique des microstructures” of Lyon1University for SEM images.

7. CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflict of interest. This project was supported by a Research grants from French research Minister of Angele Cortial PhD thesis.

8. REFERENCES

1. C. Thies, in *Microencapsulation: Methods and industrial applications*, (Ed: S. Benita), Marcel Dekker, New York, **1996** , pp. 1-20.
2. Y. Li, Y.Q. Huang, H.F. Fan, Q. Xia, *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, 131, 7.
3. Y. Li, Y.Q. Huang, H.F. Fan, Q. Xia, Heat-resistant sustained-release fragrance microcapsules. *Integr. Ferroelectr.* **2014**, 152, 1.
4. Y. Li, A. Lianzhong, W. Yokoyama, C. F. Shoemaker, D. Wei, J. Ma, F. Zhong, *J. Agr. Food Chem.* **2013**, 61, 13.
5. A. E. Edris, B. Bergnstahl, *Nahrung.* **2001**, 45, 2.
6. V. Manojlovic, N. Rajic, J. Djonlagic, B. Obradovic, V. Nedovic, B. Bugarski, *Sensors* **2008**, 8, 3.
7. G. Yilmaz, R.O. J. Jongbooma, H. Feil, W. E. Hennink, *Carbohydr.Polym.* **2001**, 145, 2.
8. I. M. Martins, S. N. Rodrigues, F. Barreiro, A. E. Rodrigues, *J. Microencapsul.* **2009**, 26, 8.
9. Y. Achmon, J. Goldshtein, S. Margel, A. Fishman, *J. Microencapsul.* **2011**, 28, 7.
10. H. Ichiura, M. Takayama, N. Nishida, Y. Otani, *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, 124, 1.
11. S. N. Rodrigues, I. M. Martins, I. P. Fernandes, P.B. Gomes, V. G. Matak, M. F. Barreiro, A. E. Rodrigues, *Chem. Eng. J.* **2009**, 149.
12. M. Tanaka, H. Matsuda, H. Sumiyoshi, H. Arima, F. Hirayama, K. Uekama, S. Tsuchiya, *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, 44, 2.
13. C. X. Wang, S. L. Chen, *Coloration Technology* **2006**, 120.
14. M. Nishikawa, Y. Takakura, M. Hashida, in *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery*, (Ed: S. Benita), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, **1992** , pp. 99–118
15. B. Magenheimer, M. Y. Levy, S. Benita, *Int. J. Pharm.* **1993**, 94, 1-3.
16. S. Benita, D. Friedmann, M. Weinstock, *Int. J. Pharm.* **1986**, 30, 1.
17. W. Mehnert, K. Mäder, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2001**, 47, 2-3.
18. R. H. Müller, S. A. Runge, in *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery*, (Ed: S. Benita), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, **1992** , pp. 219–234
19. B. Siekmann, K. Westesen, *Pharm. Pharmacol. Lett.* **1992**, 1.

20. P. Ahlin, J. Kristl, J. Šmid-Kobar, *Acta. Pharm.* **1998**, 48, 4.
21. R. H. Müller, K. Mäder, S Gohla, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, 50, 1.
22. C. zur Mühlen, W. Mehnert, K. Westesen. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, 45, 2.
23. H. Bunjes, B. Siekmann, in *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery*, (Ed: S. Benita), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, **1992** , pp. 175-204.
24. Jahnke S, in *Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs*, (Eds: R. H. Müller, S. Benita, B. Böhm), Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, **1998** , pp. 177–200.
25. B. Sjöström, B. Bergenståhl, *Int. J. Pharm.***1992**, 88, 1-3.
26. A. Edwards, N. Blickenstaff, G. Coman, H. Maibach, *Cutan. Ocul.Toxicol.* **2014**, 25.
27. A. Nardelli, A. Carbonez, J. Drieghe, A. Goossens, *Contact Dermatitis*, **2013**, 68, 5.
28. M. Seiller, C. Arguillere, P. David, F. Puisieux, A. Le Hir, *Ann. Pharm. Fr.* **1968**, 26, 7.
29. C. D. Vaughan, D. A. Rice, *J. Disper. Sci. Technol.* **1990**, 11,1.
30. A. E. Edris, C. F. Malone, *Int. J. Cosmet. Sci.* **2012**, 34, 5.
31. K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, W. E. Rudzinski, *J. Control. Release* **2001**, 29, 1-2.
32. C. Giacomelli, V. Schmidt, K. Aissou, R. Borsali, *Langmuir* **2010**, 26, 20.
33. F. Jian, Y Zhang, J. Wang, K. Ba, R. Mao, W. Lai, Y. Lin, *Curr. Drug. Metab.* **2012**, 13, 4.
34. C. Vauthier, K. Bouchemal, *Pharm. Res.* **2009**, 26, 5.
35. R. Banerjee, *J. Biomater. Appl.* **2001**, 16, 1.
36. S. R. Naik, S. K. Desai, P. D. Shah, S. M. Wala, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2013**, 7, 3.
37. A. J. Domb, M. Maniar, WO 1991007171 A1, **1991**.
38. L. A. Orafidiya, F. A. Oladimeji, *Int. J. Pharm.* **2002**, 237, 1-2.
39. R. P. Gullapalli, B. B. Sheth, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1999**, 48, 3.
40. N. Chidambaram, D. J. Burgess, *AAPS Pharm. Sci.***2000**, 2, 3.
41. S. H. Boddu, S. P. Bonam, R. Jung, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2014** [Epub ahead of print]
42. G. E. Petrowski, *Adv. Food Res.***1976**, 22.

43. T. S. Leong, T. J. Wooster, S. E. Kentish, M. Ashokkumar, *Ultrason. Sonochem.* **2009**, 16, 6.
44. G. Sandri, M.C. Bonferoni, E. H. Gökçe, F. Ferrari, F. Rossi, S. Patrini, C. Caramella. *J. Microencapsul.* **2010**, 27, 8.
45. C. Puglia, A. Offerta, L. Rizza, G. Zingale, F. Bonina, S. Ronsisvalle, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2013**, 13, 10.
46. S. Abbas, M. Bashari, W. Akhtar, W.W. Li, X. Zhang, *Ultrason. Sonochem.* **2014**, 21, 4.
47. S. Das, A. Chaudhury, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2011**, 12, 1.
48. B. Singh, P. R. Vuddanda, M. R.V. Kumar, P. S. Saxena, S. Singh, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, 121.
49. N. Dudhipala, K. Veerabrahma, *Drug Deliv.* **2014**, 28.
50. R. Cavalli, O. Caputo, E. Marengo, F. Pattarino, M. R. Gasco, *Pharmazie* **1998**, 53, 6.
51. E. B. Souto, W. Mehnert, R. H. Muller, *J. Microencapsul.* **2006**, 23, 4.
52. G. Lukowski, A. Hoell, A. Dingler, R. Kranold, P. Pflögel. *Proceed Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **1997**, 24.
53. T. Nii, F. Ishii, *Int. J. Pharm.* **2005**, 298, 1.
54. B. Peña, C. Panisello, G. Aresté, R. Garcia-Valls, T. Gumí, *Chem. Eng. J.* **2012**, 179.
55. C. Freitas, R.H. Müller, *Int. J. Pharm.* **1998**, 168, 2.
56. S. A. Wissing, O. Kayser, R.H. Muller. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, 56, 9.
57. C. Freitas, R.H. Müller, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1999**, 47, 2.
58. B. Siekmann, K. Westesen, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **1994**, 3, 3.

ARTICLE 4

Article 4. Degradable nanoparticles: suitable vectors for the transport of actives through the skin.

Actuellement, les NPs sont considérées comme de véritables promoteurs de l'absorption cutanée. Les études précédentes ont montré que les NPs pénétraient préférentiellement dans la peau *via* la voie transfolliculaire et pourraient persister dans ce conduit jusqu'à plusieurs jours. Cette durée est fonction du type de NPs appliquées et de leur taille. De nombreux travaux de recherche se sont articulés autour de cette thématique mais les données récoltées ne permettent pas à l'heure actuelle d'établir de règles précises sur la pénétration des NPs en fonction de leurs propriétés de surface, de leur taille, de leur charge électrique, de leur forme. Il est ainsi difficile de déterminer le type de NPs le plus adapté à une application donnée.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la vectorisation de molécules à travers la peau à partir de NPs dégradables à l'aide d'un modèle *in vitro* (ex vivo) standard basé sur l'utilisation de cellules de Franz. La diffusion passive des composés d'intérêt est évaluée dans les différentes assises cutanées à travers un explant de peau de porc. Ici, l'eugénol et le FMI, dont les molécules présentent un coefficient de partage compris entre 1.6 et 4.8 ont été utilisés comme standards et non pour un intérêt diagnostique ou thérapeutique. Néanmoins, il faut noter que l'eugénol est considéré dans plusieurs études comme un promoteur de l'absorption cutanée. L'eugénol a été encapsulé au sein de nanoparticules dégradables, polymères ou lipidiques. Des nanoparticules polymères de PCL et de PLGA, des liposomes de phosphatidilcholine, et des SLNs à base de vaseline, de C10-C18 triglycérides, de beurre de karité, et de palmitate de cétyle ont été formulées. Tout d'abord, nous avons cherché à établir des relations entre la pénétration des NPs dans la peau et leurs propriétés de surface. Nous avons ensuite étudié la pénétration simultanée d'un mélange de molécules et défini si les propriétés physico-chimiques des molécules encapsulées influençaient la pénétration dans les différentes couches cutanées. A l'heure actuelle, il reste également difficile de visualiser les NPs au sein de la peau. Pour répondre à cette problématique, nous avons mis en place une stratégie de suivi, basée sur l'utilisation de la microscopie électronique à balayage à partir de strippes du *stratum corneum* et de la microscopie biphotonique confocale appliquée au suivi de la distribution de NPs encapsulant du Nile-Red, marqueur fluorescent, dans l'ensemble du tissu cutané.

Les résultats de ces travaux confirment le rôle promoteur de pénétration cutanée des NPs encapsulant nos standards d'étude (eugénol et FMI) par rapport à une solution contrôle contenant un agent de solubilisation et nos molécules d'intérêt.

Néanmoins, ce caractère propre aux NPs est fonction de leurs propriétés de surface, en effet, le pourcentage de pénétration cutanée de l'eugénol varie en fonction des NPs appliquées (pourcentage calculé comme le rapport entre la quantité d'eugénol mesurée dans l'assise cutanée et la quantité totale d'eugénol déposé). Dans le *stratum corneum*, la quantité d'eugénol mesurée n'est pas significativement différente comparée à la solution contrôle quel que soit le véhicule étudié, seules les NPs de PLGA (8,6%) augmentent significativement la pénétration par rapport à la solution contrôle (2,8%). Au contraire, dans les couches les plus profondes, l'ensemble des NPs booste significativement la pénétration hormis les SLNs à base de C10-C18 triglycérides (6,8%) par rapport au véhicule contrôle (7%). Les NPs polymères se présentent comme les meilleurs promoteurs de l'absorption cutanée avec une quantité globale d'eugénol absorbée de 34,9% pour les NPs de PCL et de 26,2% pour le PLGA. Les liposomes ont démontré un pouvoir pénétrant intermédiaire de 14,2%. Parmi les SLNs, des différences de pénétration ont été également observées, les particules à base de vaseline favorisant d'avantage la pénétration (24,3%) que celles à base de palmitate de cétyle (11,3%), et de beurre de karité (9,2%).

Dans ce travail, nous avons ensuite mis en évidence que la charge électrique a une réelle influence sur le profil d'absorption cutané. Ainsi nous avons montré que la pénétration des particules anioniques (15,1%) et cationiques (12,4%) dans le SC, est plus importante que celle des particules neutres (2,4%). De plus, l'utilisation de particules anioniques a permis une meilleure pénétration de l'eugénol (46,2%) dans les couches les plus profondes, comparée à des particules neutres (34,9%) et cationiques (23,2%).

En outre, l'encapsulation d'un mélange au sein de nanoparticules modifie le profil de pénétration des particules par rapport à une forme libre. En effet, nous avons démontré que l'utilisation de NPs de PCL a permis d'augmenter et d'uniformiser la quantité de molécules de FMI pénétrant dans le SC (de 1,6 à 7,6% en fonction des molécules) en comparaison à la solution contrôle (0,1 à 1,4% en fonction de la molécule). Néanmoins, dans les couches les plus profondes, ce pourcentage a présenté de fortes variabilités en fonction des molécules comparables à celle dans la solution contrôle (profil de distribution des molécules comparables entre les deux formes) suggérant ainsi une dégradation des NPs plus en profondeur s'accompagnant d'une libération des molécules dont la pénétration sera régie par leur propriétés intrinsèques. Le coefficient de partage des molécules semblent ainsi jouer un rôle important avec optimum de pénétration obtenue pour des valeurs comprises entre 1,7 et 2,2.

Nous avons également cherché à mettre en évidence la présence de particules au sein de la peau, l'analyse par microscopie électronique à balayage a permis de visualiser des NPs intactes au sein de la couche cornée. Dans les couches plus profondes, la présence d'amas de fluorescence distribués de manière ponctuelle au sein du tissu tend à confirmer la présence de particules au sein de l'épiderme et du derme (résultats obtenus par microscopie biphotonique confocale).

L'ensemble de ce travail confirme le pouvoir promoteur des nanoparticules, pouvant se placer comme des outils adaptés à la délivrance ciblée de plusieurs actifs dans les différentes assises cutanées pour favoriser le développement de polythérapie.

Biodegradable nanoparticles: suitable vectors for the transport of active through the skin.

(A soumettre)

A. Cortial^{1,2}, Bolzinger MA¹, M. Vocanson², A. Rozières², M. Guene¹, M. Perbet¹, J Pelletier¹, S. Briançon¹

¹Université de Lyon, F-69622, Lyon, France, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, France

²Université de Lyon, F-69622, Lyon, France, Université Lyon 1, ENS Lyon, INSERM U1111 – CNRS UMR5308, Centre de Recherche en Infectiologie, France

Abstract

Purpose: The objective of this work was to compare the skin penetration of several nanocarriers loaded with eugenol. The influence of surface charge and the simultaneous penetration of molecules (Fragrance Mix I) were also studied.

Methods: The pig skin penetration of Poly-(ε)-caprolactone (PCL) NPs, poly-(lactiglycolic acid) NPs, SLNs (with petrolatum, cetyl palmitate, C10-18 triglycerides and shea butter), and liposomes were studied with a static diffusion cell. The surface charge influence was determined with PCL-NPs. Scanning electron microscopy and confocal microscopy were performed on skin sections to visualize the NPs distribution into the skin.

Results: The mean size of the NPs was close to 200 nm and the encapsulation efficiency was 50 % for polymeric nanoparticles and liposomes and 90 % for SLNs. All formulations enhanced the skin penetration but polymeric NPs particles presented the best enhancement. Moreover, the study of anionic NPs favored the skin penetration. All molecules of the mix penetrated with the same profile into the SC and in the deeper layer, the molecule with log P ranging from 1.6 to 2.2 presented the best skin penetration.

Conclusions: These results suggest that the encapsulation of a complex mixture into anionic PCL – NPs is a promising strategy to target cells in the dermis.

Key-words: (5) polymeric nanoparticles, SLNs, skin penetration, fragrance mix I, eugenol,

Abbreviations

NP: nanoparticle

SLN: solid lipid nanoparticle

PCL : poly-ε-caprolactone

PEG : poly ethylene glycol

PLGA: poly(lactic-co-glycolic acid)

SC: stratum corneum

PDI: polydispersity index

GC: gas chromatography

HPLC: high performance liquid chromatography

FMI: fragrance mix I

UA: unit area

FID: flame ionization detector

SS : skin surface

E: epidermis

D: dermis

RC: receptor compartment

SEM: scanning electron microscopy

1. Introduction

Nanotechnology has really taken off during the last thirty years. Nanoparticles (NPs) present very low size which confers specific properties, including a high surface area and unique physical features (shape, surface charge). These vectors can be divided into two categories, soluble and degradable NPs (polymeric nanoparticles, liposomes, solid lipid nanoparticles...) or insoluble and non-degradable NPs (metallic oxides, fullerenes, quantum dots...) (1). NPs can have many potential applications in medicine for treatment and diagnosis (2-4). They offer new possibility to improve delivery, bioavailability and targeting of drugs into the skin. The topical delivery of administration presents unique advantages; it's a noninvasive method, the drugs or actives are directly delivered to the site of the disease, a low amount of drug is necessary to produce therapeutic effect, no plasma peaking of drugs, decrease the frequent dosing (5). Biodegradable and biocompatible NPs were mainly used for topical application to avoid toxic effects (6).

The transport of NPs through the skin is related to the nature and physicochemical properties of NPs. Liposomes were the first structures employed in the dermatological field (7). Then, these structures were substituted by solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve the stability (8). In the past few years, a large number of polymeric nanoparticles are reported as drug delivery system into the skin (5,6,8-10). Biodegradable polymers were tested especially poly-ε-caprolactone (PCL) (11), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and chitosan (5). NPs were loaded with a large variety of drugs and actives, lipophilic or hydrophilic.

The skin is a complex structure protecting the body against toxic substances, pathogens and organisms. This barrier function is mainly regulated by the stratum corneum (SC), the outermost layer of the epidermis (5). However, the molecules can penetrate the skin *via* three pathways including the intercellular, transcellular and transfollicular routes (12,13). The penetration of the molecules *via* these routes is depends on parameters described in Table 1. Only the hydrophilic molecules (with a partition coefficient comprised between -1 and 4) and with a low molecular weight (below 500 Da) can pass the skin barrier across the SC (6,14,15).

Table 1. Parameters affecting the penetration of molecules in the skin

Parameters affecting the skin penetration	
Molecule	<ul style="list-style-type: none"> - Molecular weight and size - Partition coefficient (lipophilicity/ hydrophobicity) - Ionization with pH - Concentration
Formulation	<ul style="list-style-type: none"> - Solubility and polarity - Volatility - Excipients - pH
Application conditions	<ul style="list-style-type: none"> - Temperature - Humidity - Occlusion - Application duration - Skin surface
Application zone	<ul style="list-style-type: none"> - Skin type (race, age, sex) - Area (hair, forehead, arms...) - Skin hydration - Skin surface (lesions)

NPs are used as enhancers of the skin penetration of encapsulated molecule especially by transfollicular pathway especially the NPs with a size ranging from nanometer to submicron dimension, a spherical shape and positive electronic charge (10,16,17). Moreover, NPs present a role of reservoir for the deliverance of drug into the skin. Drugs loaded in NPs can persist for several days into hair follicles (18). In all the articles, the NP penetration was determined by visualizing a fluorescent dye loaded into NPs, but the degradation of NPs into the skin was not studied and there is no evidence for the translocation of entire particles across the SC of healthy skin (6). Only one article published in 2010, reported that these carriers penetrated across epidermal sheets of pig ears (19).

However, this article is debated, the penetration was evaluated with only an epidermal sheet heated at 60°C, this procedure which can damage the lipids of SC and affect the skin barrier.

was reached. Then, this phase was dripped into chitosan solution under magnetic stirring at 600 rpm during 4 h in order to cover the NP surface with chitosan, providing a positive charge.

2.2.2. SLNs

Firstly, the lipid phase containing lipids (5% w/w *i.e.* 1 g) and surfactant(s) was heated at 70°C to melt the lipids, and dissolve the surfactants in this liquid phase (Table 2). Then, deionized water previously heated at 70°C (20 mL) and 0.5% (*i.e.* 100 mg) of perfumes (fragrance mix or eugenol) were added. The mixture was stirred at 24000 rpm during 5 min using a rotor stator (Ultra-Turrax T25 Basic with D8 rotor-stator, IKA-Werke). An emulsion with a single population of droplets was achieved. Ultra-sounds were applied in the emulsion to decrease the droplet size by a plane probe of 13 mm diameter (Bioblock scientific vibra cell 75042). The conditions of ultrasounds are described in Table 2. During these two steps, the mixture was maintained at 70°C, after sonication the nanoemulsion was cooled down to 0°C without stirring.

Table54. SLN composition and experimental conditions

SLNs	Surfactant (%w/w)		Ultrasounds	
			Duration (s)	Power (W)
Shea butter	Sorbitan laurate (1%)		-	-
Cetyl palmitate	Polysorbate 40 (0.37%)	Sorbitan palmitate (0.63%)	90	300
Petrolatum	Polysorbate 40 (0.24%)	Sorbitan palmitate (0.26%)	60	300
C10-C18 - triglycerides	Polysorbate 40 (1%)		60	400

2.2.3. Liposomes

Liposomes were also prepared with the nanoprecipitation process [65]. First, 400 mg of phosphatidylcholine were dissolved in 20 mL ethanol (organic phase). 200 mg of eugenol were added in the organic phase. Then, the organic phase was dripped into 40 mL of the deionized water under magnetic stirring at 600 rpm. Liposomes were formed instantaneously by diffusion of ethanol in the aqueous phase. Ethanol was then removed by evaporation under reduced pressure (100 mbar) at 40°C (Büchi Rotavapor R-124) until a final volume of 40 mL was reached.

2.3. Control solution

A micellar solution was prepared as control. Oleth- 10 was chosen as surfactant in order to solubilize the hydrophobic fragrances in water. A solution of oleth-10 at 5 % (w/w) (*i.e.* 50 g per 1 L of water) was prepared. A solution of eugenol or fragrance mix at $5 \cdot 10^{-4}$ % (w/w) (*i.e.* 100 µg in 20 mL of the solution of oleth-1) was formulated.

2.4. NP characterization

2.4.1. Fragrance encapsulation in polymeric NPs and liposomes

Fragrance total recovery was determined by dissolving 50 µL of NP or liposomes suspensions in 1 mL of acetone (for fragrance mix) or methanol (for eugenol) and quantifying fragrances in this solution by GC (for fragrance mix) or by HPLC (for eugenol). The fragrance recovery (% recovery) was calculated by dividing this quantity by the initial fragrance amount introduced in the preparation (Eq 1).

For the determination of fragrance encapsulation, 1 mL of NP or liposome suspension was centrifuged at 14000 rpm for 30 min to separate the nanoparticles or the liposomes from the continuous phase. 500 µL of supernatant were taken off and mixed with 500 µL of acetone (for fragrance mix) or methanol (for eugenol). GC assay of these solutions gave the non-encapsulated fragrances. Measurements were replicated two times. The fragrance recovery (% recovery) and the encapsulation efficiency (EE %) were calculated respectively by Eq.1 and Eq.2.

$$\% \text{ recovery} = \left[\frac{\text{weight of fragrance}}{\text{initial weight of fragrance in the preparation}} \right] \times 100 \text{ (Eq.1)}$$

$$\%EE = \left[\frac{\text{weight of fragrance} - \text{weight of fragrance non encapsulated}}{\text{initial weight of fragrance in the preparation}} \right] \times 100 \text{ (Eq.2)}$$

2.4.2. Fragrance encapsulation in SLN

The fragrance total recovery was determined by dissolving 250 µL of SLN suspension in 5 ml of acetone (for fragrance mix) or in methanol (for eugenol). After centrifugation (15 min under 7800 rpm), fragrances and eugenol were extracted from the lipid phase by acetone or methanol at 50°C and total fragrance was quantified by gas chromatography (GC) for fragrance mix and by high performance liquid chromatography (HPLC) for eugenol. In parallel, 400 µL of SLN suspension were centrifuged at 14,000 rpm for 30 min with microfilters of 10 kDa to separate the nanoparticles from the continuous phase. Supernatant was collected, put in 1 mL of acetone (for fragrance mix) or methanol (for eugenol) and analyzed by GC to determine the quantity of fragrance which was not encapsulated in the NPs.

2.4.3. Eugenol assay by high performance liquid chromatography

Eugenol quantification was performed with HPLC system (Agilent) consisting in a solvent pump equipped with autosampler injector and UV visible and diode strip detector. Separation was performed with RP18-e (250 x 4.6 mm, 5 µm i.d) column. The mobile phase was composed of a mixture of methanol and water (60:40). The elution was realized with isocratic gradient at a flow rate of 1 mL/min. The eugenol was detected at 254 nm. The retention time was 5.5 (±0.04) min and the total analysis time was 7 min. This method was validated with a good repeatability and reproducibility (SD < 0.05). The detection limit for eugenol quantification was evaluated at 11 ng/g and quantification limit was 35 ng/mL. The quantification of eugenol in methanol used calibration curves (three curves with seven points each) ranged between 4 µg/g and 4 mg/g with a slope of 7.3 [AU].g/µg (±0.2), with correlation coefficient $r^2 > 0.99$.

2.4.4. Fragrance mix assay by gas chromatography

Fragrance quantification was performed by GC with flame ionization detector (GC-FID). Analysis was carried out using Shimadzu GC 2010 plus equipped with split/splitless injector and capillary column Equity-5™ (30 m x 0,25 µm, 0.25 µm film thickness) conditioned at 300°C for 30 min before use. The carrier gas was helium (He) at a constant flow rate of 1 mL/min with a pressure of 100 kPa. The FID detector temperature was maintained at 350°C. The sample volume injected was 2 µL. For analysis, the oven temperature was increased from 100°C to 190°C at 2.5°C/min. The total program time was 35 min. Fragrance retention times (min) and quantification limits are given in Table 3.

Table 3. Fragrance retention times and quantification limits for fragrances components. Slope and intercept of regression line are the average of 3 measurements for each point.

Fragrance name	Retention times (min)	Quantification limits (ng/g in acetone)	Regression slope [UA].g/µg
Geraniol	11.4	59	132.3 (±1.1)
Cinnamaldehyde	12.3	59	125.7 (±4.9)
7-hydroxycitronellal	12.7	51	94.8 (±0.3)
Cinnamyl alcohol	13.5	56	114.0 (±0.3)
Eugenol	15.6	54	102.5 (±0.9)
Isoeugenol	19.7	50	89.1 (±0.8)
(α)-amylcinnamaldehyde	28.6	52	134.9 (±2.4)

2.4.5. Size distribution and zeta potential

NP size distribution was determined by photon correlation spectroscopy and Zeta potential was measured using an interferometric laser called M3 Phase Analysis Light Scattering- (Zeta Sizer Nano ZS, Malvern Instrument). NP or liposome suspensions were diluted in deionized water (pH comprised between 6 and 7) at 25°C. The analysis model was multimodal narrow modes (high resolution) with a display range between 0.6 and 6000 nm with a lower threshold of 0.05 and an upper threshold of 0.01. Results are the average of 3 measurements per sample and 14 runs per measure. This instrument measured the mean size and the polydispersity index (PDI) which reflects the size distribution. 20 µL of NP suspension were diluted in 2 mL to measure the Zeta potential which was calculated by Smoluchowski's equation from the electrophoretic mobility of nanoparticles.

2.5. Skin penetration study

2.5.1. Static diffusion – Frantz cell method

Skin penetration was studied using the static diffusion method (Franz cell) with the protocol of Rolland et al. [66]. Skin samples were isolated from the flanks of pigs (close to 25 kg, Male), as it is recognized that pig skin is an adequate model of human skin for permeation and penetration studies (22, 23). Full-thickness pig skins were obtained from the Laboratoire de Physiologie (Université de Lyon, France). First, skin pieces were washed with deionized water and blotted with soft household paper. The bristles were cut with hair clipper. The subcutaneous tissue was removed with a scalpel to obtain a thickness ranging between 1.2 and 1.5 mm measured with a micrometer (Mitutoyo, Japan). The skin discs were stored flat at -20°C until use (within 3 months) (24, 25). Before use, skin samples were thawed at room temperature, then mounted on Franz-type glass diffusion cells (Laboratoire Verre Labomodula, Corbas, France) and placed in a thermostated water bath at 37°C in order to get keep a skin surface temperature of $32 \pm 1^\circ\text{C}$. The membrane area available for diffusion was 2.54 cm². The dermal side was exposed to the receptor fluid and the SC to the air.

For skin penetration analysis, receptor compartment was filled with a solution at 5% (w/w) oleth-10 and stirred with magnetic bar. It was previously checked that the solubility of fragrance mix and eugenol in this solution was enough to ensure sink conditions. NP or liposomes suspensions and control solution were deposited on the skin surface. The quantity of each formulation was adjusted to reach an applied dose of fragrances or eugenol at the skin surface of 785 µg/cm². The experiment was conducted for 24 h, and the fragrance concentration in the receptor fluid was quantified throughout time.

At the end of the 24 h exposure, the formulation remaining at the skin surface was removed and the fragrance amount was quantified and called SS (residual amount). The skin samples were carefully removed from the diffusion cells and skin stripping was performed to detach the SC (26-28). 30 adhesives with a diameter of 22 mm (D-Squame®, Monaderm, Monaco) were successively applied during 30 s under a weight of 500 g. The first strip was analyzed separately and the others were pooled by 9 (2-10; 11-20 and 21-30 strips). Fragrances were extracted from the adhesives by putting them in 10 mL of acetone or methanol for 30 min in an ultrasonic bath at 40°C, with 30 min of ultrasounds for the first two extractions and with 1 h for the latest. This protocol was validated in a preliminary study showing that all molecules were extracted from the strips after 3 extractions. The total amount of fragrances recovered was called SC.

Then epidermis was separated from the dermis with dissection after being immersed in water at 60°C for 45 s. No fragrance was found in the separation water. Epidermis and dermis were cut in small pieces and put in acetone or methanol for fragrance extraction during 1h30 in an ultrasounds bath at 40°C. Fragrances contained in the epidermis (called E) and in the dermis (called D) was quantified in the extraction solvent.

The receptor fluid was collected and mixed with 11 mL of analysis solvent and fragrances were quantified and called (RC).

2.5.2. Analysis of NP penetration in the SC by scanning electron microscopy

Skin penetration of PCL-NPs was evaluated. The SC was detached with tape-stripping (30 strips). SEM analysis of strips (n° 1, 2, 5, 15, 30) was performed using a microscope Hitachi, S800 FEG. Adhesives were first metalized with 10 nm of platinum in an evaporator by cathodic sputtering. The observation was performed under a 10 kV voltage.

2.5.3. Skin penetration analysis by multi-photon confocal microscopy

PCL-NPs were prepared according to the protocol described §2.2.1.1, except that fragrances were replaced by Nile Red as fluorescent tracer. The suspension of Nile Red loaded NPs was applied on the skin samples during 24 h in the conditions described previously. After 24 h of exposure, skin samples were taken off from the cells and biopsies were taken with an 8 mm punch biopsy device. The biopsies were embedded and frozen in Tissue-Tek® OCT (Ames Division, Miles Laboratories Inc, USA) at -77°C (methanol + dry ice). Ten-micrometer cryostat sections were collected on slides and were stocked at -20°C before analysis. They were observed with a multi-photon confocal microscopy Nikon consisting in an upright microscope FN1® and a multi-photon confocal microscopy A1R MP PLUS® with laser emission and excitation wavelengths of 629.0 nm and 810.0 nm respectively.

2.6. Statistical analysis

All experiments of skin penetration were performed two times on four different pigs for PCL NPs and three times on three pigs for other formulations. For fragrance quantification was repeated two times for each three samples. Results are expressed as Mean \pm Standard Deviation. An unpaired T test was used to compare the influence of various formulations. Two tailed P-value less than 0.01 was considered significant noted *, P<0.001 noted ** and P<0.001 noted ***. Correlation regression was obtained with Graph Pad Prism and spearman correlation was used with two-tailed P values.

3. Results

3.1. Influence of NP type on the skin penetration of eugenol

Eugenol with a log P of 2.2 was considered as a model molecule for our skin penetration study. Eugenol was loaded into several types of NPs including PCL-NPs, PLGA-NPs, shea butter SLNs, petrolatum SLNs, cetyl palmitate SLNs, C10-18 triglyceride SLN and phosphatidylcholine liposomes. The physicochemical properties of these preparations are given in Table 4. The mean size was comprised between 104.8 nm (± 0.7) for the liposomes and 210.5 nm (± 2.8) for C10-18 triglycerides SLNs, the size distributions were narrow (PDI ≤ 0.26). Eugenol encapsulation efficiency (EE%) greatly depended on the type of nanoparticles, it was low for polymeric NPs (51.9 % for PCL-NPs and 41.6 % for PLGA-NPs) but high with other nanoparticles, higher than 90 %, except for C10-18 SLNs (76.1 %). The surface charge of polymeric NPs was zero due to the presence of non-ionic surfactant, the other formulations presented a negative Zeta potential. The pH of all the preparations was close to that of the skin comprised between 5.0 and 5.5.

Table 4. Properties of the Nanoparticles loaded with eugenol.

Formulation	Mean size (nm)	Polydispersity index (PDI)	Zeta potential (mV)	pH	EE%
PCL-NPs	142.7 (± 0.4)	0.057 (± 0.021)	0.1 (± 0.1)	5.3	51.9 (± 4.9)
PLGA-NPs	128.6 (± 1.1)	0.134 (± 0.019)	-0.0 (± 0.2)	5.3	41.6 (± 3.4)
Liposomes	104.8 (± 0.7)	0.179 (± 0.007)	-14.2 (± 0.3)	5.1	90.2 (± 2.6)
Petrolatum-SLNs	204.5 (± 1.5)	0.243 (± 0.055)	-28.6 (± 0.6)	5.2	97.3 (± 0.3)
Cetyl palmitate-SLNs	195.4 (± 2.1)	0.199 (± 0.011)	-27.8 (± 0.4)	5.0	98.1 (± 0.1)
C10-C18 Triglycerides SLNs	210.5 (± 2.8)	0.255 (± 0.0379)	-11.5 (± 1.3)	5.0	76.1 (± 0.9)
Shea butter SLNs	165.6 (± 0.5)	0.191 (± 0.018)	-18.6 (± 2.9)	5.0	96.7 (± 2.7)
Control solution	-	-	-	5.5	-

The distribution eugenol in the skin obtained with these different carriers is reported in Table 5. For all preparations, the major part of eugenol was retained at the skin surface (SS). The amount of eugenol remaining at the skin surface varied from 89 % (C10-18 SLNs) to 58.6 % (PCL NPs). The control solution, SLNs and liposomes resulted in similar quantities of eugenol at the skin surface (between 10.1 % and 89 %), whereas it was significantly lower with polymeric NPs (58.6 % and 61.6 %). The quantity of eugenol in the SC was similar with all NPs and there was no significant difference with the control solution, except the PLGA NPs which resulted in a significantly higher amount of eugenol in the SC (8.6 % (± 1.7)) (Figure 2A).

Considering the total quantity absorbed in the skin layers (epidermis+dermis+receptor fluid), polymeric NPs, liposomes, petrolatum SLNs and cetyl palmitate SLNs significantly enhanced the eugenol Qabs compared to the control solution (Figure 2B). On the contrary, C10-18 triglycerides SLNs and shea butter SLNs did not improve significantly the skin penetration of eugenol. PCL NPS showed the highest absorption enhancement, consequently they were selected in the following part of the study on the surface charge.

The penetration in the deeper layers of the skin was largely improved by NPs-PCL. Thus, for the other experiments, PCL-NPs were studied presenting a role of enhancer for eugenol penetration.

Table 5. *In vitro* skin distribution of eugenol as a percentage of applied dose (mean (%) \pm SD, n = 3 with 3 different pigs) except for control solution, PCL-NPs and cetyl palmitate (n = 8 with 4 different pigs).

	Control solution	Polymeric NPs		Liposomes Phosphatidilcholine	SLNs			
		PCL	PLGA		Petrolatum	C10-18 tryglicerides	Shea butter	Cetyl palmitate
SS	86.1 (± 4.2)	58.6 (± 7.9)	61.6 (± 4.9)	85.1 (± 1.4)	70.1 (± 1.5)	89.0 (± 6.2)	82.0 (± 5.2)	81.7 (± 4.3)
SC	2.8 (± 3.5)	2.4 (± 0.7)	8.6 (± 3.5)	3.9 (± 0.3)	5.2 (± 0.2)	1.4 (± 0.3)	4.2 (± 1.3)	1.8 (± 0.6)
E	0.2 (± 0.1)	0.7 (± 0.3)	0.5 (± 0.2)	0.0 (± 0.2)	1.8 (± 0.4)	1.2 (± 0.9)	0.5 (± 0.6)	0.7 (± 0.4)
D	1.0 (± 0.3)	7.5 (± 4.5)	3.7 (± 2.7)	1.7 (± 0.3)	7.4 (± 0.5)	2.4 (± 0.5)	1.6 (± 1.6)	3.9 (± 2.9)
RC	5.8 (± 1.6)	26.7 (± 7.2)	22.0 (± 4.0)	12.5 (± 3.0)	15.3 (± 3.5)	3.3 (± 1.2)	7.1 (± 5.6)	6.7 (± 1.9)
Qabs	7.0 (± 1.9)	34.9 (± 6.6)	26.23 (± 2.4)	14.2 (± 3.1)	24.3 (± 2.6)	6.8 (± 1.2)	9.2 (± 4.7)	11.3 (± 3.7)
Total	95.9 (± 4.2)	96.0 (± 3.7)	96.4 (± 1.1)	103.3 (± 1.8)	99.9 (± 1.5)	97.2 (± 4.9)	95.4 (± 2.4)	94.9 (± 4.0)

SS: skin surface, SC : Stratum corneum E: epidermis, D: dermis, RC: receptor compartment, Qabs: total absorbed (E+D+RC).

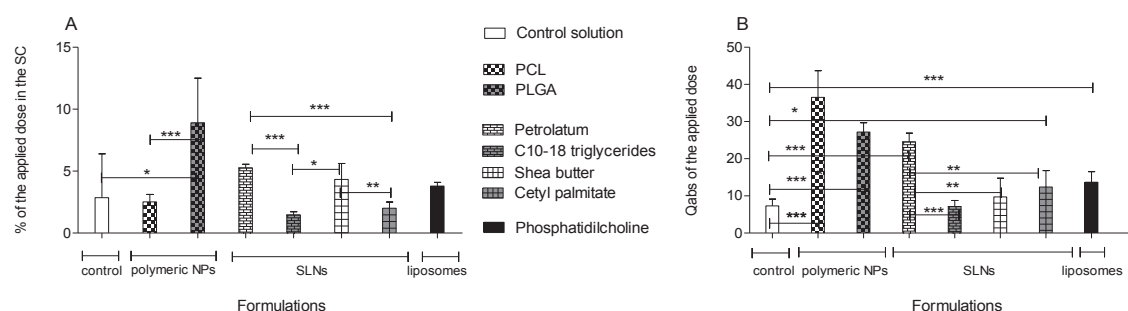


Figure 2. Eugenol skin penetration as a function of the type of nanoparticles: NPs (PCL –NPs and PLGA-NPs), liposomes (phosphatidilcholine) and SLNs (petrolatum, C10-18 triglycerides, shea butter, and cetyl palmitate), with n = 3 for 3 different pigs. A – Percentage of the applied dose recovered in the SC and B- Percentage of the applied dose in the other skin layers and receptor compartment (Qabs). Statistical analysis: P< 0.01 is noted *, P<0.001 is noted ** and P<0.001 noted ***. All types of NPs were compared together, only the significant difference were represented in the graphic.

3.2. Influence of the electric charge of NPs on the skin penetration of eugenol

In this part, the penetration of PCL nanoparticles loaded with eugenol and with a negative surface charge (stabilized by an anionic surfactant...), a positive surface charge (NPs covered by chitosan) and neutral NPs (NPs stabilized by a non-ionic surfactant as previously studied) was measured. The properties of these NPs are described in Table 6. Neutral PCL-NPs (Zeta potential -0.1 mV (± 0.2)) and negative PCL-NPs (Zeta potential -27.5 mV (± 1.2)) presented similar characteristic in terms of size (142.7 nm and 116.5 nm) and pH (5.3). The preparation of positive PCL-NPs required the adsorption of chitosan on the surface of particles in an acid medium to dissolve the chitosan, consequently the final pH of the preparation was lower (pH=4.5) than that of the other preparations. Also the mean size of positive PCL-NPs (289.7 nm (± 1.2)) differed, it was higher than that of the other preparations, probably due to the additional chitosan layer around the NPs. The EE% was slightly lower for neutral PCL-NPs (51.9 % (± 4.9)). Negative PCL-NPs and positive PCL-NPs resulted in EE% of respectively 64.9 % and 59.4 %

Table 6. Properties of neutral, positive and negative PCL-NPs

NPs	Mean size (nm)	Polydispersity index (PDI)	Zeta potential (mV)	pH	EE%
Neutral PCL -NPs (tween 80)	142.7 (± 0.4)	0.057 (± 0.021)	0.1 (± 0.1)	5.3	51.9 (± 4.9)
Negative PCL-NPs	116.5 (± 0.4)	0.126 (± 0.021)	-27.5 (± 1.2)	5.3	64.9 (± 0.2)

The results of eugenol skin penetration as a function of the surface charge are reported in Table 7.

Table 7. *In vitro* skin distribution of eugenol as a percentage of the applied dose (mean (%) \pm SD, n=8 with 4 different pigs).

	Control solution	Positive	PCL-NPs Negative	neutral
SS	86.1 (± 4.2)	47.5 (± 10.4)	35.0 (± 5.2)	58.6 (± 7.9)
SC	2.8 (± 3.5)	12.4 (± 3.5)	15.1 (± 3.6)	2.4 (± 0.7)
E	0.2 (± 0.1)	2.0 (± 1.3)	1.5 (± 0.5)	0.7 (± 0.3)
D	1.0 (± 0.3)	2.9 (± 0.8)	10.2 (± 3.7)	7.5 (± 4.5)
RC	5.8 (± 1.6)	18.3 (± 4.0)	34.5 (± 7.6)	26.7 (± 7.2)
Qabs	7.0 (± 1.9)	23.2 (± 2.8)	46.2 (± 4.9)	34.9 (± 6.6)
Total	95.9 (± 4.2)	95.6 (± 6.2)	96.3 (± 6.8)	96.0 (± 3.7)

SS: skin surface, E: epidermis, D: dermis, RC: receptor compartment, Qabs: total absorbed (E+D+RC).

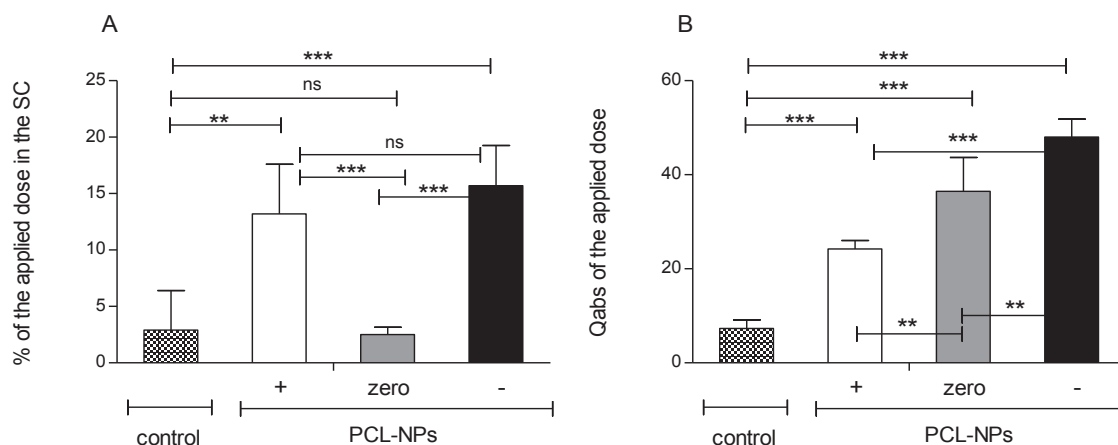


Figure 3. Skin penetration of Eugenol from three types of PCL- NPs and a control solution. Neutral PCL-NPs grease bars, positive PCL-NPs: with blank bars, negative PCL-NPs: black bars; control solution: hatched bars. A –eugenol as a percentage of the applied dose recovered in the SC and B- eugenol as a percentage of the applied dose recovered in the other skin layers and receptor compartment (Qabs). Statistical analysis: $P < 0.01$ is noted *, $P < 0.001$ is noted ** and $P < 0.001$ noted ***, ns= non significant.

Results showed that the skin distribution of eugenol was greatly altered by the charge of particles. The amount of eugenol recovered in the SC was significantly higher for charged particles ($>10\%$) than with neutral particles (2.4 % (± 0.7)) and control solution (2.8 % (± 3.5)) (Figure 3A). However, there was no significant difference between the results obtained with the two charged particles and the sign of the electric charge did not influence the penetration of eugenol in the SC.

When eugenol was loaded into PCL-NPs whatever the charge of the particles, the total quantity absorbed in the skin layers (amount > 20%) was significantly improved compared to the control solution (7.0 % (± 1.9)) (Figure 3B). Furthermore, Qabs was significantly different for each kind of NPs which can be sorted in ascending order : positive particles (23.2 % (± 2.8)), neutral particles (34.9 % (± 6.6)) and negative particles (46.2 % (± 4.9)) (Figure 3B). Thus, the higher penetration of eugenol was obtained with negative particles whatever the layer of the skin, even if no significant difference with positive NPs was observed in the SC.

3.3. Influence of the NPs on the skin penetration of fragrance mix

PCL NPs loaded with the fragrance mix FMI were prepared to study the simultaneous penetration of several molecules in the skin. PCL-NPs had a mean size of 125.6 (± 5.6) nm and a Zeta potential of 0.1 (± 2.3) mV. The encapsulation efficiency of each molecule is reported in Table 8. It varied from 8.3 % to 84.8 %, lower values were obtained with hydrophilic molecules. Eugenol encapsulation was slightly lower than when encapsulated alone but the difference was not significant. The results of skin penetration of each molecules are reported in Table 9 (control solution) and Table 10 (NPs).

Table 8. Encapsulation efficiency of the fragrance mix molecules in PCL-NPs

	log P	EE%
Hydroxycitronellal	1.65	8.3 (± 1.4)
Cinnamyl alcohol	1.70	14.9 (± 0.9)
Cinnamaldehyde	2.12	38.5 (± 1.1)
Eugenol	2.20	48.1 (± 0.8)
Isoeugenol	2.45	59.2 (± 1.2)
Geraniol	3.28	53.5 (± 0.8)
α -amylcinnamal	4.80	84.8 (± 0.3)

Table 9. *In vitro* skin distribution of fragrance mix as a percentage of the applied dose - control solution as (mean (%) \pm SD, n=8 with 4 different pigs).

	Control solution						
	Hydroxycitronellal	Cinnamyl alcohol	Cinnamaldehyde	Eugenol	Isoeugenol	Geraniol	α -amylcinnamal
SS	95.9 (± 11.6)	85.2 (± 6.0)	76.2 (± 6.0)	99.4 (± 7.4)	97.3 (± 7.0)	95.7 (± 6.3)	94.0 (± 4.4)
SC	0.1 (± 0.1)	0.1 (± 0.1)	0.3 (± 0.0)	0.2 (± 0.0)	0.0 (± 0.0)	0.3 (± 0.03)	1.4 (± 0.3)
VE	0.0 (± 0.0)	0.0 (± 0.0)	0.1 (± 0.1)	0.0 (± 0.0)	0.0 (± 0.0)	0.0 (± 0.0)	0.2 (± 0.2)
D	0.31 (± 0.3)	1.6 (± 0.7)	3.1 (± 1.0)	0.7 (± 0.6)	0.0 (± 0.0)	0.9 (± 0.4)	1.2 (± 0.3)
RC	2.1 (± 2.4)	14.0 (± 3.8)	14.4 (± 6.3)	3.4 (± 1.4)	0.0 (± 0.0)	2.1 (± 1.7)	0.0 (± 0.0)
Qabs	2.4 (± 2.6)	15.6 (± 3.8)	17.5 (± 6.3)	4.1 (± 1.9)	0.0 (± 0.0)	2.5 (± 2.1)	1.3 (± 0.5)
Total	98.4 (± 11.1)	101.0 (± 4.7)	94.1 (± 9.4)	103.6 (± 8.0)	97.3 (± 7.0)	98.5 (± 5.1)	96.7 (± 4.3)

Table 10. *In vitro* skin distribution of fragrance mix as a percentage of the applied dose PCL-NPs (mean (%) \pm SD, n=8 with 4 different pigs).

	PCL-NPs						
	Hydroxycitronellal	Cinnamyl alcohol	Cinnamaldehyde	Eugenol	Isoeugenol	Geraniol	α -amylcinnamal
SS	92.4 (± 4.5)	57.6 (± 3.0)	58.0 (± 9.2)	70.6 (± 4.0)	51.0 (± 1.3)	69.4 (± 9.7)	86.4 (± 5.1)
SC	4.3 (± 2.7)	2.2 (± 1.8)	2.7 (± 1.4)	2.1 (± 0.7)	1.6 (± 0.6)	3.7 (± 1.9)	7.6 (± 5.4)
VE	0.1 (± 0.0)	0.4 (± 0.3)	0.5 (± 0.4)	0.8 (± 0.2)	0.8 (± 1.5)	0.2 (± 0.2)	0.9 (± 0.7)
D	0.6 (± 0.2)	3.4 (± 0.8)	4.4 (± 1.5)	4.7 (± 0.8)	2.0 (± 0.4)	5.2 (± 1.3)	3.1 (± 1.3)
RC	6.9 (± 3.9)	34.0 (± 5.6)	29.1 (± 7.9)	21.6 (± 3.5)	0.0 (± 0.0)	14.1 (± 2.4)	0.0 (± 0.0)
Qabs	7.5 (± 4.1)	37.8 (± 5.6)	34.0 (± 7.9)	27.1 (± 3.3)	2.8 (± 1.3)	19.5 (± 2.1)	4.0 (± 1.9)
total	104.2 (± 4.7)	97.6 (± 6.4)	97.4 (± 5.2)	100.0 (± 2.7)	95.4 (± 2.3)	96.4 (± 6.1)	105.6 (± 5.3)

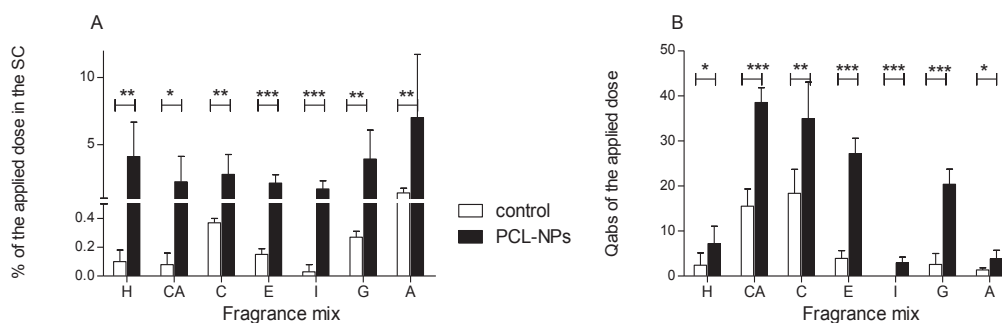


Figure 4. Skin penetration of the seven molecules of fragrance mix H: 7-hydroxycitronellal, CA: Cinnamyl alcohol, C: Cinnamaldehyde, E: Eugenol, I: Isoeugenol, G: Geraniol and A: Alpha-amylcinnamaldehyde. A – Percentage of the applied dose recovered in the SC and B- Percentage of the applied dose recovered in skin the other skin layers and receptor compartment (Qabs).

Regardless of the nature of the molecule, the encapsulation into NPs enhanced their skin penetration into the SC and into the deeper layers compared to the control solution as already observed

with eugenol. In the SC, the quantity of all molecules was not significantly different when loaded in PCL-NPs, whereas their penetration when applied as control solution was different and was correlated with their log P ($r_{\text{pearson}}=0.8894$, P_{value} (two-tailed) =0.0074, **) (Figure 4A). In the deeper layers the quantity recovered (Qabs) depended on the nature of the molecule for both formulations. Qabs ranged from 0 % (I) to 17 % (C) of the applied dose when the solution was applied; and from 2.8 % (I) to 37.8 % (CA) when PCL NPs were applied. The order of magnitude of Qabs differed between the control solution and the NPs, however a similar tendency was observed according the molecule nature (Figure 4B). The maximum of penetration was obtained with molecules having a midrange log P.

To determine if the application of several molecules simultaneously influenced the skin penetration, the distribution of eugenol in the skin layers when applied alone or in the mixture is represented in Figure 6. Considering the control solution, a slight but not significant increase in the penetration of eugenol both in the SC and in the deeper layers was found when applied alone. When encapsulated, no significant difference was measured in the SC, but in the deeper layers, the penetration of eugenol was significantly lower when it was applied with other fragrance molecules.

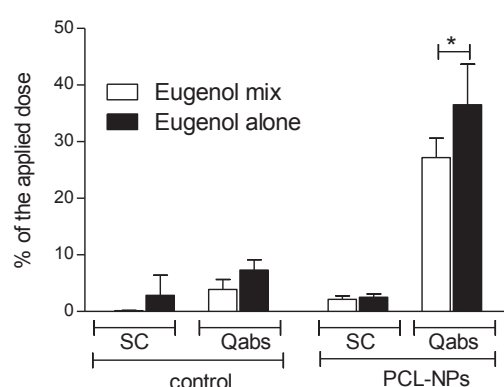


Figure 6. Skin penetration of Eugenol in the SC and in the other layers (Qabs) – eugenol was applied alone (black bars) or in the mixture of fragrances (blank bars) Statistical analysis: $P < 0.01$ is noted *, $P < 0.001$ is noted ** and $P < 0.001$ noted ***. All conditions were compared, only the significant difference were represented in the graphic.

3.4. Skin penetration observation by microscopy

The skin penetration of PCL NPs was observed by two methods. The penetration of NPs in the SC was evaluated by the SEM observation of the tape-strips. PCL-NPs mean size of 185.2 nm with a PDI of 0.153 and zeta potential of 0.1 mV were applied during 24 h on the skin sample. As shown in figure 7 representing an image of the tape strip n° 5 (corresponding approximately to a 10 μm depth), nanoparticles were observed in the whole SC. This image also proves that the PCL-NPs were not entirely degraded after 24 h (Figure 7).

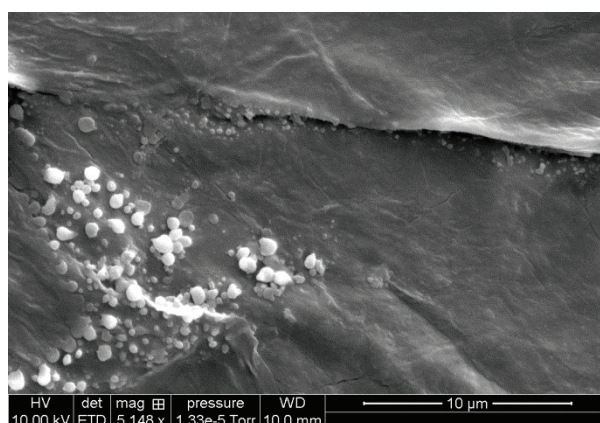


Figure 7. Scanning electron microscopy image of tape- strip N°5 - magnitude 5148 x. (corresponding approximately to a 10 μm depth). Scale bar represents 10 μm .

The analysis of the deeper skin layers was performed by multi-photon confocal microscopy and PCL-NPs encapsulating a fluorescent label, Nile Red. These nanoparticles had a mean size of 195.8 nm with a PDI of 0.145 and a Zeta potential -0.5 mV and were applied during 24 h on the skin sample. The multi-photon confocal microscopy observation showed the presence of NPs into the SC and into the dermis. NP repartition was isolated (NPs didn't recover all the surface skin) and may translated interactions with different skin structures (Figure 8).

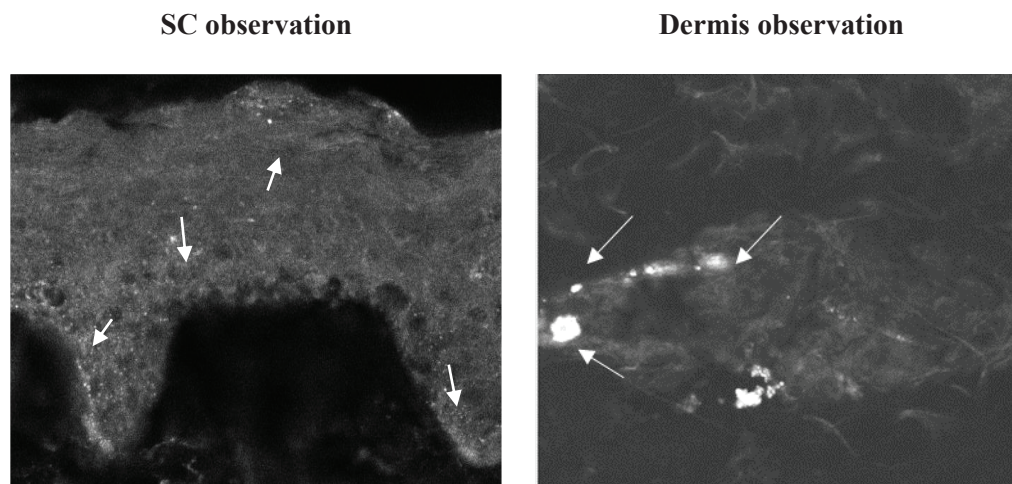


Figure 8. Multi-photon confocal microscopy images of skin cryo-section (thickness of 10 μm), observation of the SC and dermis. Aggregates of nanoparticles were visualized with white pointed by an arrow.

4. Discussion

Skin delivery of drugs constitutes an alternative to conventional routes of administration as oral or parenteral (67) and presenting several advantages as the reduction of pain, the elimination of hepatic first pass metabolism and the possibility to achieve a sustained drug release for a prolonged period... (29). Furthermore, nanoparticles represent an innovative tool to enhance the skin penetration and improve the drug delivery (30). In this work, the behavior of degradable NPs applied *in vitro* on skin samples was studied. The objective was to compare several types of NPs in order to define, the parameters influencing the skin penetration of molecules encapsulated in these NPs. The penetration of the fragrances was quantified using static diffusion cells and the NPs were observed in the skin by scanning electron microscopy and multi-photon confocal microscopy. Fragrances were studied as model molecules. Due to their presence in cosmetic products or perfumes, these molecules are often applied on the skin; some of them were also used as enhancers of the skin penetration (terpenes) (31-34). These molecules can disrupt the structure of the lipids in the SC (35), resulting in a fluidization of their organization and a decrease of the barrier function.

4.1. Influence of the type of NPs on the skin penetration of eugenol

Eugenol with a log P of 2.2. was chosen as model molecule to evaluate the influence of the type of NPs on the skin penetration. Eight formulations were tested including two polymeric NPs (PCL and PLGA-NPs), four SLNs (petrolatum, cetyl palmitate, triglycerides, shea butter), and liposomes (phosphatidylcholine). The mean size of all nanoparticles was below 250 nm with a narrow size distribution (PDI below 0.25). NPs were neutral (polymeric NPs), negative (polymeric NPs, SLNs and liposomes) or positive (polymeric NPs). The pH of all preparations was adjusted between 5.0 and 5.5, close to the pH of the skin (4.2-5.6 (37)).

Results showed that all NPs significantly enhanced the eugenol skin penetration (except the C10-18 triglycerides SLNs and shea butter SLNs) (Figure 2). Eugenol loaded in the liposomes or in the SLNs presented a similar profile of penetration. It was noticed that petrolatum SLNs was a potent

enhancer (Qabs % = 24.3 (± 2.6)) compared to the other lipid structures (Qabs < 15 %) and the highest penetration of eugenol was obtained with polymeric NPs (Qabs > 22.0 (± 4.0)).

SC is a lipophilic layer, composed of protein-rich cells called corneocytes embedded in a lipid extracellular matrix (38); the corneocytes are fixed together by intercellular protein structures named corneodesmosomes (39). Depending on their composition, NPs interact differently with the SC. Bouwstra et al. reported that lipid-based particles have the tendency to merge with the skin lipid layers, unlike polymeric particles which are more hydrophilic (40), thus the penetration in the deeper layers of the skin was favored by polymeric carriers. For example, lipid NPs can be fused with the extracellular lipids of the SC. Petrolatum NPs presented a high penetration in the SC (5.2 % (± 0.2)) and could have a role of reservoir. SC is a dynamically evolving structure due to desquamation process, substances accumulated in the stratum disjunctum are eliminated very quickly, whereas SC can function as a reservoir for those particulate materials penetrating deeper across the SC to the viable skin layers (6). Clares et al. studied the non-viable human skin penetration of retinyl palmitate (RP) (log P = 14.83, Predicted data is generated using the ACD/Labs Percepta Platform - PhysChem Module) loaded in phosphatidylcholine liposomes and glyceryl behenate SLNs. The RP permeation (amount in the receptor compartment) was similar between these two structures whereas the skin retention (epidermis + dermis) was significantly higher with liposomes compared to SLNs (41). The results of this study were quite different; thus the permeation rate of eugenol was dependent on the type of nanoparticles but the skin retention was similar except with petrolatum SLNs, which resulted in a similar a significant higher skin retention compared to the other SLNs and to the liposomes (Figure 9B).

du Plessis et al. reported that liposomes are able to reach to pilosebaceous units. They compared the penetration of γ -interferon loaded in liposomes on hamster skin, human skin and hairless mouse. In the deeper skin strata, the percent of applied drug found per application followed the order: hamster (6.1) much greater than human (0.9) greater than hairless mouse (0.3). The increase of the penetration was correlated with the follicles/hair number in the skin species, suggesting that the follicular pathway could be a route for drug deposition from liposome (43). Lu et al. explained this result by the existence of interactions between the lipophilic environment into hair follicles and the phospholipids of liposomes (44). Furthermore, phospholipids may present an affinity for biological membranes (45). El Maghraby et al. suggested that phospholipids penetrate deeply into the stratum corneum and facilitating the movement of lipophilic molecules. In their experiment, they showed that SC membranes were immersed into blank phospholipid based formulation for 10 min and a remarkable uptake of oestradiol was obtained (the ratio was enhanced of 4.3) (46).

Santos Maia et al. showed that SLNs allowed targeting the epidermis, studying the penetration of prednicarbate (log P = 4.2) loaded in SLNs or included in a classical cream. They reported SLNs allowed to transport prednicarbate in excised human skin and reconstructed epidermis. The drug recovery from the acceptor medium was about 2 % of the applied amount following PC cream and ointment and 6.65 % for SLN dispersion. In order to study the effect of encapsulation, the penetration of prednicarbate mixed with blank SLNs was compared to prednicarbate loaded into SLNs (47). Results showed that the penetration of prednicarbate was not enhanced with blank SLNs. Nevertheless, Clares et al. reported, in cosmetic products, that SLNs were considered as moisturizing *via* an occlusive effect by preventing transepidermal water loss (41).

Results showed that polymeric NPs could be considered as enhancers of skin penetration. They resulted in significantly higher absorption of eugenol both in the SC and in the whole skin compared to the liposomes and SLNs. Many studies reported the accumulation of NPs in the first skin layers and in skin furrows, as well as their ability to improve the drug penetration in the skin (18, 48, 49). The penetration of polymeric polystyrene NPs was studied by Alvarez-Roman et al *in vitro* on porcine skin. Following NPs loaded with fluorescein 5-isothiocyanate (FTIC) by confocal laser scanning microscopy, the authors showed that polymeric NPs accumulated into skin furrows and into hair follicles. (48). Shim et al. measured the penetration of minoxidil (log P = -0.458) loaded in poly- ϵ -caprolactone poly-(ethylene glycol) diblock copolymer nanoparticles *in vitro* on hairy and hairless guinea pig skin. Small size (40 nm) and large nanoparticles (130 nm) were used. Results showed that

the hair follicles pathway was favored especially with small size nanoparticles. This size dependence was not observed with hairless skin samples. The importance of the follicular pathway was proved through confocal microscopy observations showing an accumulation of NP in the hair follicles (49).

Küchler et al. compared the penetration of a fluorescent tracer (Nile Red, log P=5) encapsulated in glyceryl behenate SLNs with a mean size ranging between 150 and 170 nm and in polymeric dendritic core multi-shell nanotransporters based on poly-glycerol with a mean size ranging between 30 and 40 nm. Polymeric nanotransporters were able to increase the skin penetration in the SC and in the epidermis 2 fold higher than SLNs (50).

The results obtained in this study are in accordance with the literature, showing an accumulation of all carriers in the SC and a higher potential of polymeric NPs to promote the deep penetration of eugenol.

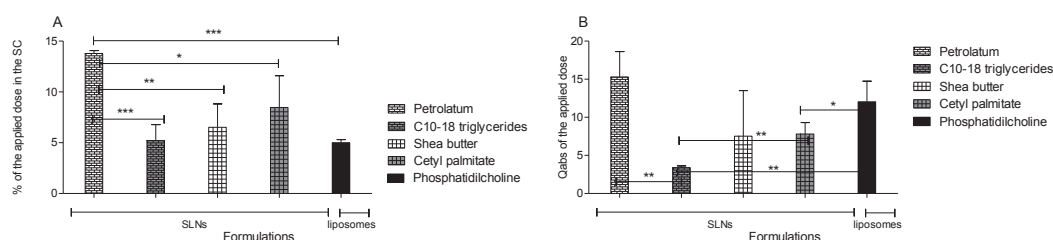


Figure 9. Skin penetration of Eugenol from SLNs and liposomes . A – Eugenol in the skin (SC+E+D) as a percentage of the applied dose B- eugenol permeation (RC) as a percentage of the applied Statistical analysis: P< 0.01 is noted *, P<0.001 is noted ** and P<0.001 noted ***. All formulations were compared, non-significant differences are not represented on these figures.

To confirm the NP skin penetration, microscopy techniques were used. Few studies assessed the penetration of intact NPs into the skin. Generally, just the penetration of fluorescent molecule was traced in microscopy. In order to evaluate the penetration of NPs in the SC, the tape stripes were analyzed by scanning electron microscopy. Intact NPs were found in the SC as already observed by Campbell et al. They studied the penetration of fluorescent polystyrene NPs into pig skin by confocal microscopy and found an accumulation of NPs in the SC (63). The penetration of intact particles into the skin was also measured by confocal microscopy. The analysis showed the zone with agglomerated NPs I with high fluorescence in the SC and also in the dermis. Miyazaki et al. studied the penetration of poly-(n-butyl cyanoacrylate) nanocapsules loaded with rhodamin 6 into the skin by confocal microscopy and suggested that the nanocapsules have penetrated intact through the rat skin and were found all the skin(64).). Furthermore, Teixeira et al. studied the skin penetration polymeric nanocapsules with elastic characteristics loaded with Nile blue in poly-(D,L-lactide) matrice (size distribution was 215 nm, PDI 0.1) by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Results showed that nanocapsules were distributed uniformly and these authors suggested that these NPs penetrated through skin by intercellular mechanism (42). Thus, there is no rule to predict the penetration of polymeric nanoparticles, it was depend on NP composition and properties.

4.2. Influence of the electric charge of NPs on the skin penetration of eugenol

In the literature, many studies indicated that the skin penetration is largely influenced by the properties of the particles (shape, size, surface...) (51, 52). In our study, the influence of the surface electric charge was studied with PCL-NPs having a size ranging between 110 and 290 nm loaded with eugenol. Results showed that the eugenol penetration in the SC with anionic (15.1 % (± 3.6)) and cationic (12.4 % (± 3.5)) particles was similar and the amount of eugenol recovered in the SC was 5 to 6 fold higher than with neutral NPs (2.4 % (± 0.7)). The absorption of eugenol in the skin was also influenced by the particle charge; anionic NPs resulted in the highest amount of eugenol in the skin (46.2 % (± 4.9)) followed by neutral NPs (34.9 % (± 6.6)) and cationic NPs (23.2 % (± 2.8)).

These results were in accordance with Gillet et al. data. They showed that negatively charged liposomes significantly enhance betamethasone and betamethasone dipropionate penetration in the

epidermis compared to positively charged and neutral phosphatidylcholine liposomes into pig ear skin, these results were confirmed by confocal microscopy (58). Furthermore, Lee O et al. studied the penetration of gold nanoparticles (mean size <10 nm) into hair-less mice skin with positive and negative charges by transmission electron microscopy. Their analysis revealed that negative particles penetrated more rapidly in the skin and the extent of negative NPs in the receptor fluid was higher after 48 h exposure. However, no significant difference was observed in the receptor fluid at shorter exposure time (8 h and 24 h) (54). Abdel-Mottaleb et al. studied the influence of the charge of ethyl cellulose NPs with a mean size close to 100 nm loaded with Nile Red or with betamethasone in vivo using an experimental dermatitis inflammation model in mice ears. The images of confocal laser scanning microscopy showed an accumulation of NPs on the inflamed skin surface, the hair follicle and the sebaceous glands higher than on healthy skin. No difference was measured within particles whatever their charge. However, the evaluation of the therapeutic effect showed that negatively and positively charged NPs were more efficient than neutral NPs (55). Duangjit et al. prepared liposomes with a mix of cholesterol and phosphatidylcholine loaded with meloxicam stabilized with nonionic, cationic and anionic surfactants and studied their skin penetration in vitro. The penetration kinetics was measured by meloxicam analysis in the receptor compartment throughout time. No difference was recorded between anionic and cationic particles, and liposomes with electronic charge enhanced the meloxicam skin penetration compared to neutral liposomes (57).

However, other studies provided that cationic nanoparticles were the best enhancer of the skin penetration. Song et al. published contradictory results studying the skin penetration of low-molecular-weight heparin loaded into cationic liposomes, anionic and neutral liposomes. They showed that the penetration into the deeper skin layers was significantly better from cationic flexible liposomes than from anionic and neutral flexible liposomes (53). However, heparin is a large molecule compared to eugenol, and the behavior of these two molecules in the skin could be different independently of their carrier. Chen et al. observed the tripterine loaded nanostructured lipid carrier skin penetration. Cationic, anionic, and neutral NLCs were prepared with different matrix structure. They found that the cumulative penetration of tripterine was the greatest from the cationic NLCs and the highest accumulation of tripterine in the deeper skin layers, followed by the neutral and anionic NLCs. This study suggested that the skin is a negatively charged membrane due to anionic molecules such as cholesterol sulfate and that cationic carriers could interact with these molecules through electrostatic attraction for NPs (51). Dragicevic-Curic et al. studied the skin penetration of temoporfin loaded in anionic, cationic and neutral flexosomes with human abdominal skin. They showed that cationic flexosomes delivered the highest amount of temoporfin was found in stratum corneum and deeper skin layers than neutral and anionic flexosomes in accordance to the results of Chen et al. (68).

The analysis of the literature articles indicated that no role can be established to predict the skin penetration, generally charged particles penetrate deeper in the skin compared to nonionic particles.

4.3. Influence of the NP type on the skin penetration of the fragrance mix

The penetration of several molecules simultaneously applied in the same NPs was evaluated. As already observed with eugenol, the penetration of all molecules in the SC and in the whole skin was enhanced with NPs compared to the control solution. The quantity of all molecules recovered in the SC was similar and no significant difference could be observed. On the contrary, it was shown that the log P of the molecules influenced the penetration the deeper layer, Log P describes the partitioning of a molecule between an aqueous and a lipid phase. This partition arises after application of the NP on the skin, the aqueous phase being the vehicle in which NPs are dispersed and the lipid phase the intercellular lipids of the SC. In the literature, it is recognized that the log P is indicative of the penetration ability (69). Idson et al. showed that a molecule penetration is directly proportional to its partition coefficient (59) and Hawkins et al. showed that the penetration of compounds with a lower log P increased to a greater extent (log P=2) than compounds with a higher log P (log P=5) (60). In accordance with Hawkins, in this experiment, cinnamaldehyde (log P=2.1), cinnamyl alcohol (log P=1.7) and eugenol (log P=2.2) presented a higher penetration, whatever the form, (control solution or NPs). It was also shown that the quantity of eugenol in the deeper layers was higher than that of geraniol (log P=3.28). Mutalik et al. studying the penetration of glibenclamide and glipizide on mouse skin showed that eugenol was a better skin penetration enhancer than geraniol but they did not explore the penetration rate of the enhancers (61). Comparing the penetration behavior of eugenol applied

alone or in the mixture of fragrances showed that the presence of others molecules influenced the ability of eugenol to access to the deep skin layers. The penetration of eugenol in the skin was decreased in the presence of other fragrances. This could also be due to the lower amount of eugenol applied on the skin when it was mixed with the other molecules. Furthermore, the other chemical presented in the mixture could affected the eugenol skin penetration changing the properties of the lipid phase SC or the protein domain (62).

5. Conclusion

Our aim was to determine the parameters influencing the skin penetration of eugenol from several NP carriers. First of all, the profile of penetration of three types of NPs was determined including polymeric NPs, SLNs and liposomes. Polymeric NPs prepared with PCL and PLGA were the highest enhancers of eugenol penetration. Moreover, the analysis by scanning electron microscopy and confocal microscopy suggested that PCL-NPs penetrated intact into the skin. Phosphatidylcholine liposomes, cetyl palmitate SLNs and petrolatum SLNs presented a similar impact and improved preferentially the penetration into the SC. Shea butter SLNs and C10-18 triglycerides had no influence compared to the control solution. Secondly, the influence of the particle charge was evaluated with polymeric NPs. A high penetration into SC was measured with cationic and anionic particles, and in the deeper layers the penetration was optimized with negative particles. The analysis of the penetration of the fragrance mix loaded into PCL-NPs showed that all the molecules encapsulated into NPs presented a similar penetration into SC. In the deeper skin layers, the penetration of the molecules was related to their log P, with a maximum penetration rate for the molecules having a log P comprised between 1.6 and 2.2. This behavior was observed when the molecules were applied in solution or encapsulated in NPs.

6. Acknowledgments

We thank the “Centre technologique des microstructures” of Lyon1 University for SEM images and the ‘Ingenierie et vieillissement des tissus vivants” of Ecole Centrale de Lyon for multi-photon confocal microscopy images. This project was supported by a Research grants from French research Minister of Angele Cortial PhD thesis.

7. References

1. Lohani A, Verma A, Joshi H, Yadav N, Karki N. Nanotechnology-based cosmeceuticals. *ISRN Dermatol.* 2014;2014:843687.
2. Sanna V, Pala N, and Sechi M. Targeted therapy using nanotechnology : focus and cancer. *Int J Nanomedicine.* 2014;**9**:467-83.
3. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS and Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;**83**(5):761–9.
4. Doane TL, Burda C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy *Chem Soc Rev.* 2012; **41**(7):2885–911.
5. Zhang Z, Tsai PC, Ramezanli T, Michniak-Kohn BB. Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2013;**5**(3): 205-18.
6. Rancan F, Blume-Peytavi U, Vogt A. Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2014;**7**:23-34.
7. Egbaria K, Weiner N. Liposomes as a topical drug delivery system. *Adv Drug Deliver Rev.* 1990;**5**(3):287–300.
8. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;**54** (Suppl 1):S131–S55.
9. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. *Drug Target Insights.* 2007;**2**:147–57.

10. Lademann J, Richter H, Meinke MC, Lange-Asschenfeldt B, Antoniou C, Mak WC, Patzelt A. Drug Delivery with Topically Applied Nanoparticles: Science Fiction or Reality. *Skin Pharmacol Physiol.* 2013;26(4-6), 227-33.
11. Pohlmann AR, Fonseca FN, Paese K, Detoni CB, Coradini K, Beck RC, Guterres SS. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013;10(5):623-38.
14. Benson H. Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Curr Drug Deliv.* 2005; 2(1): 23-33.
15. Magnusson B, Pugh W, Roberts M. Simple rules defining the potential of compounds for transdermal delivery or toxicity. *Pharm Res.* 2004; 21(6): 1047-54.
16. Baroli B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? *J Pharm Sci.* 2010;99(1):21–50.
17. Watkinson AC, Bunge AL, Hadgraft J, Lane ME. Nanoparticles do not penetrate human skin – a theoretical perspective. *Pharm Res.* 2013;30(8):1943–6.
18. Lademann J, Richter H, Teichmann A, et al. Nanoparticles – an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;66(2):159–64.
19. Samah NA, Williams N, Heard CM. Nanogel particulates located within diffusion cell receptor phases following topical application demonstrates uptake into and migration across skin. *Int J Pharm.* 2010; 401(1-2):72–8.
20. Nardelli A, Carbonez A, Drieghe J, Goossens A. Results of patch testing with fragrance mix 1, fragrance mix 2, and their ingredients, and Myroxylon pereirae and colophonium, over a 21-year period. *Contact Dermatitis.* 2013;68(5),307-13.
21. Fessi, H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm.* 1989;55(1): R1-R4.
22. Bronaugh RL, Stewart RF, Congdon ER. Methods for in vitro percutaneous absorption studies II. Animal models for human skin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1982;62(3):481–8.
23. Bronaugh RL, Stewart RF, Simon M. Methods for in vitro percutaneous absorption studies VII: Use of excised human skin. *J Pharm Sci.* 1986;75(11):1094–7.
24. Harrison SM, Barry BW, Dugard PH. Effects of freezing on human skin permeability. *J Pharm Pharmacol.* 1984; 36(4): 261–2.
25. Schaefer UF, Loth H. An ex-vivo model for the study of drug penetration into human skin. *Pharm Res.* 1996;13(Suppl.): 366.
26. Clarys P, Gabard B, Lambrecht R, Barel A, Bieli E, Ludi S. There is no influence of a temperature rise on in vivo adsorption of UV filters into the stratum corneum. *J Dermatol Sci.* 2001; 27(2): 77–81.
27. Weigmann HJ, Lademann J, Schanzer S, Lindemann U, von Pelchrzim R, Schaefer H, Sterry W, Shah V. Correlation of the local distribution of topically applied substances inside the stratum corneum determined by tape-stripping to differences in bioavailability. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001; 14 (Suppl 1): 98–102.
28. Jimenez MM, Pelletier J, Bobin MF, Martini MC. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. *Int J Pharm.* 2004; 272(1-2): 45–55.
29. Tanner T, Marks R. Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. *Skin Res Technol.* 2008; 14 (3):249–60.
30. Papakostas D, Rancan F, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Nanoparticles in dermatology. *Arch Dermatol Res.* 2011; 303(8):533-50.
31. Varman RM, Singh S. Investigation of effects of terpene skin penetration enhancers on stability and biological activity of lysozyme. *AAPS PharmSciTech.* 2012;13(4):1084-90.

32. Magnusson BM, Runn P, Karlsson K, Koskinen LD. Terpenes and ethanol enhance the transdermal permeation of the tripeptide thyrotropin releasing hormone in human epidermis. *Int J Pharm.* 1997;157(1):113–21.
33. Nair VB, Panchagnula R. The effect of pretreatment with terpenes on transdermal iontophoretic delivery of arginine vasopressin. *Farmaco.* 2004;59(7):575-81.
34. Yerramsetty KM, Rachakonda VK, Neely BJ, Madihally SV, Gasem KA. Effect of different enhancers on the transdermal permeation of insulin analog. *Int J Pharm.* 2010;398(1-2): 83–92.
35. Sapra B, Jain S, Tiwary AK. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: mechanistic view. *AAPS J.* 2008;10(1):120-32.
37. Rawlings AV, Voegeli R. Stratum corneum proteases and dry skin conditions. *Cell Tissue Res.* 2013;351(2):217–35.
38. Michaels AS, Chandrasekaran SK, Shaw JE. Drug permeation through human skin: theory and in vitro experimental measurement. *AICHE J.* 1975;21(5):985–96.
39. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008;17:1063–72.
40. Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL. Skin structure and mode of action of vesicles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(Suppl 1):S41–S55.
41. Clares B, Calpena AC, Parra A, Abrego G, Alvarado H, Fanguero JF, Souto EB. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. *Int J Pharm.* 2014;473(1-2):591-8.
42. Teixeira Z, Zanchetta B, Melo BA, Oliveira LL, Santana MH, Paredes-Gamero EJ, Justo GZ, Nader HB, Guterres SS, Duran N. Retinyl palmitate flexible polymeric nanocapsules: characterization and permeation studies. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2010; 81(1):374-80.
43. du Plessis J, Egbaria K, Ramachandran C, Weiner N. Topical delivery of liposomally encapsulated gamma-interferon. *Antivir Res.* 1992;18(3-4):259–65.
44. Lu GW, Valiveti S, Spence J. Comparison of artificial sebum with human and hamster sebum samples. *Int J Pharm.* 2009; 367(1-2): 37–43.
45. Valjakka-Koskela R, Kirjavainen M, Mönkkönen J. Enhancement of percutaneous absorption of naproxen by phospholipids. *Int J Pharm.* 1998 ;175(2): 225-30.
46. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Skin delivery of oestradiol from deformable and traditional liposomes: mechanistic studies. *J Pharm Pharmacol.* 1999;51(10): 1123-34.
47. Santos Maia C, Mehnert W, Schaller M, Korting HC, Gysler A, Haberland A, Schäfer-Korting M. Drug targeting by solid lipid nanoparticles for dermal use. *J Drug Target.* 2002;10(6):489-95.
48. Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release.* 2004;99(1): 53-62.
49. Shim J, Seok Kang H, Park WS, Han SH, Kim J, Chang IS. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J Control Release.* 2004;97(3):477-84.
50. Küchler S, Radowski MR, Blaschke T, Dathe M, Plendl J, Haag R, Schäfer-Korting M, Kramer KD. Nanoparticles for skin penetration enhancement--a comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009 ;71(2):243-50.
51. Chen Y, Zhou L, Yuan L, Zhang ZH, Liu X, Wu Q. Formulation, characterization, and evaluation of in vitro skin permeation and in vivo pharmacodynamics of surface-charged tripterine-loaded nanostructured lipid carriers. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:3023-32.
52. Manosroi A, Kongkaneramt L, Manosroi J. Stability and transdermal absorption of topical amphotericin B liposome formulations. *Int J Pharm.* 2004; 270(1-2):279–86.

53. Song YK, Kim CK. Topical delivery of low-molecular-weight heparin with surface-charged flexible liposomes. *Biomaterials*. 2006;27(2):271-80.
54. Lee O, Jeong SH, Shin WU, Lee G, Oh C, Son SW. Influence of surface charge of gold nanorods on skin penetration. *Skin Res Technol*. 2013; 19(1):390-6.
55. Abdel-Mottaleb MM, Moulari B, Beduneau A, Pellequer Y, Lamprecht A. Surface-charge-dependent nanoparticles accumulation in inflamed skin. *J Pharm Sci*. 2012;101(11):4231-9.
57. Duangjit S, Pamornpathomkul B, Opanasopit P, Rojanarata T, Obata Y, Takayama K, Ngawhirunpat T. Role of the charge, carbon chain length, and content of surfactant on the skin penetration of meloxicam-loaded liposomes. *Biomacromolecules*. 2014;9:2005-17.
58. Gillet A, Compère P, Lecomte F, Hubert P, Ducat E, Evrard B, Piel G. Liposome surface charge influence on skin penetration behaviour. *Int J Pharm*. 2011;411(1-2):223-31.
59. Idson B. Percutaneous absorption. *J Pharm Sci*. 1975;64(6):901-24.
60. Hawkins GS, Reifenrath WG. Influence of skin source, penetration cell fluid, and partition coefficient on in vitro skin penetration. *J Pharm Sci*. 1986;75(4):378-81.
61. Mutalik S, Udupa N. Effect of some penetration enhancers on the permeation of glibenclamide and glipizide through mouse skin. *Pharmazie*. 2003;58(12):891-4.
62. Bezema FR, Martin E, Roemele PEH, Brussee J, Bodde HE, deGroot HJM. H-2 NMR evidence for dynamic disorder in human skin induced by the penetration enhancer Azone. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectrosc*. 1996; 52(7):785-91.
63. Campbell CS, Contreras-Rojas LR, Delgado-Charro MB, Guy RH. Objective assessment of nanoparticle disposition in mammalian skin after topical exposure. *J Control Release*, 2012; 162(1):201-7.
64. Miyazaki S, Takahashi A, Kubo W, Bachynsky J, Löbenberg R. Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: in vitro release and in vivo skin penetration. *J Pharm Pharm Sci*. 2003;6(2):238-45.
65. Jaafar-Maalej C, Diab R, Andrieu V, Elaissari A, Fessi H. Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *J Liposome Res*. 2010 ;20(3):228-43.
66. Rolland P, Bolzinger MA, Cruz C., Briançon S, Josse D. Human scalp permeability to the chemical warfare agent VX. *Toxicol In Vitro*. 2011; 25(8) :1974-80.
67. Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol*. 2008;26(11):1261-8.
68. Dragicevic-Curic N, Gräfe S, Gitter B, Winter S, Fahr A. Surface charged temoporfin-loaded flexible vesicles: in vitro skin penetration studies and stability. *Int J Pharm*. 2010;384(1-2):100-8.
69. Potts RO, Guy RH. Predicting skin permeability. *Pharm Res*. 1992; 9(5):663-9.

ARTICLE 5

Article 5. Encapsulation of hydrophobic allergens into nanoparticles improves the *in vitro* immunological diagnosis of allergic contact dermatitis

Les NPs, présentant une grande surface spécifique, possèdent un fort pouvoir de solubilisation. Au cours de ces travaux, nous avons capitalisé sur cette propriété pour le développement d'un nouveau test diagnostique *in vitro* de l'EAC aux parfums, basé sur un test de lymphoprolifération secondaire (TTL).

Actuellement, le diagnostic de l'EAC repose principalement sur la réalisation de patch-tests visant à reproduire expérimentalement une lésion d'EAC sur la peau saine de patients suspectés d'allergie. Néanmoins cette approche présente des inconvénients : (i) - le protocole est très consommateur de temps pour le patients, car 3 à 6 consultations sont nécessaires, (ii) - l'interprétation des résultats peut être difficile et doit être réalisée par des cliniciens expérimentés, enfin (iii) - il existe un risque de sensibilisation active pour les patients. Pour pallier à ces inconvénients, des tests immunobiologiques basés sur la détection de lymphocytes T spécifiques d'haptènes circulant dans le sang du patient ont été développés, se présentant comme une alternative intéressante à la technologie des patch-tests. Dans ces tests, les haptènes sont directement introduits dans les milieux de culture hydrophiles. Des résultats prometteurs ont été obtenus avec des composés hydrophiles, tels que certains colorants capillaires, des métaux ou des médicaments. Cependant, jusqu'à présent le développement de ces approches *in vitro* a largement été entravé par le manque de solubilité de la plus part des allergènes de contact qui sont responsables d'EAC chez l'homme. Or, dans les tests immunobiologiques, une bonne solubilité des molécules est essentielle pour restimuler de façon efficace les leucocytes collectés du sang des patients.

Dans ce travail, nous nous sommes basés sur l'utilisation de NPs polymères de PCL, et l'encapsulation de fragrance mix I, pour diagnostiquer à l'aide d'un test *in vitro* des patients suspectés d'allergie aux parfums. En effet, le FMI, qui est composé comme nous l'avons vu préalablement de plusieurs allergènes majeurs de la parfumerie, est classiquement utilisé pour diagnostiquer de ce type d'allergie. A ce titre, une étude clinique multicentrique a été conduite afin de récolter du sang de patients suspectés d'allergie aux parfums. Ainsi, 31 patients, présentant une histoire clinique d'eczéma ont reçu une batterie d'allergènes dont le FMI. Du sang a été prélevé chez chacun des patients après la pose des patch-tests. Une fois purifiées, les leucocytes sanguins ont alors été cultivés, pendant 5 jours, en présence de vecteurs nanoparticulaires encapsulant du FMI, ainsi que de nanoparticules contrôles (nanoparticules vides).

Nos résultats montrent que les NPs permettent d'améliorer de façon très significative la solubilité des 8 composés du FMI dans un milieu de culture conventionnel. De plus, nous avons également mis en évidence que les NPs sont internalisées activement par l'ensemble des leucocytes sanguins (monocytes, lymphocytes B et lymphocytes T). Enfin, l'utilisation de NPs encapsulant du FMI a permis une réactivation robuste des lymphocytes T effecteurs mémoires circulants chez de nombreux patients présentant des résultats de patch-tests positifs au FMI. Au contraire, aucune réactivation n'a été observée chez des patients présentant des résultats négatifs.

L'encapsulation de mélanges / substances hydrophobes dans des vecteurs nanoparticulaires représente donc une approche prometteuse pour améliorer le diagnostic immunobiologique de l'EAC.

Encapsulation of hydrophobic allergens into nanoparticles improves the *in vitro* immunological diagnosis of allergic contact dermatitis

(Revised version submitted in Nanomedicine)

Angèle Cortial¹⁻⁶, Aurore Rozières²⁻⁶, Marie Baeck⁷, Laurence De Montjoye⁷, Sophie Grande⁸, Stéphanie Briançon¹, Jean-François Nicolas^{2-6, 8} and Marc Vocanson²⁻⁶

Affiliations

¹ UMR CNRS 5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, Université Lyon1, Lyon.

² CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Lyon, France.

³ Inserm, U1111, Lyon, France.

⁴ Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France.

⁵ Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France.

⁶ CNRS, UMR 5308, Lyon, France.

⁷ Cliniques Universitaires Saint-Luc, Belgique, Université Catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique.

⁸ Allergology & Clinical Immunology, CH Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France.

Correspondence:

Marc Vocanson, CIRI-INSERM U1111, 21 avenue Tony Garnier 69007 Lyon, France

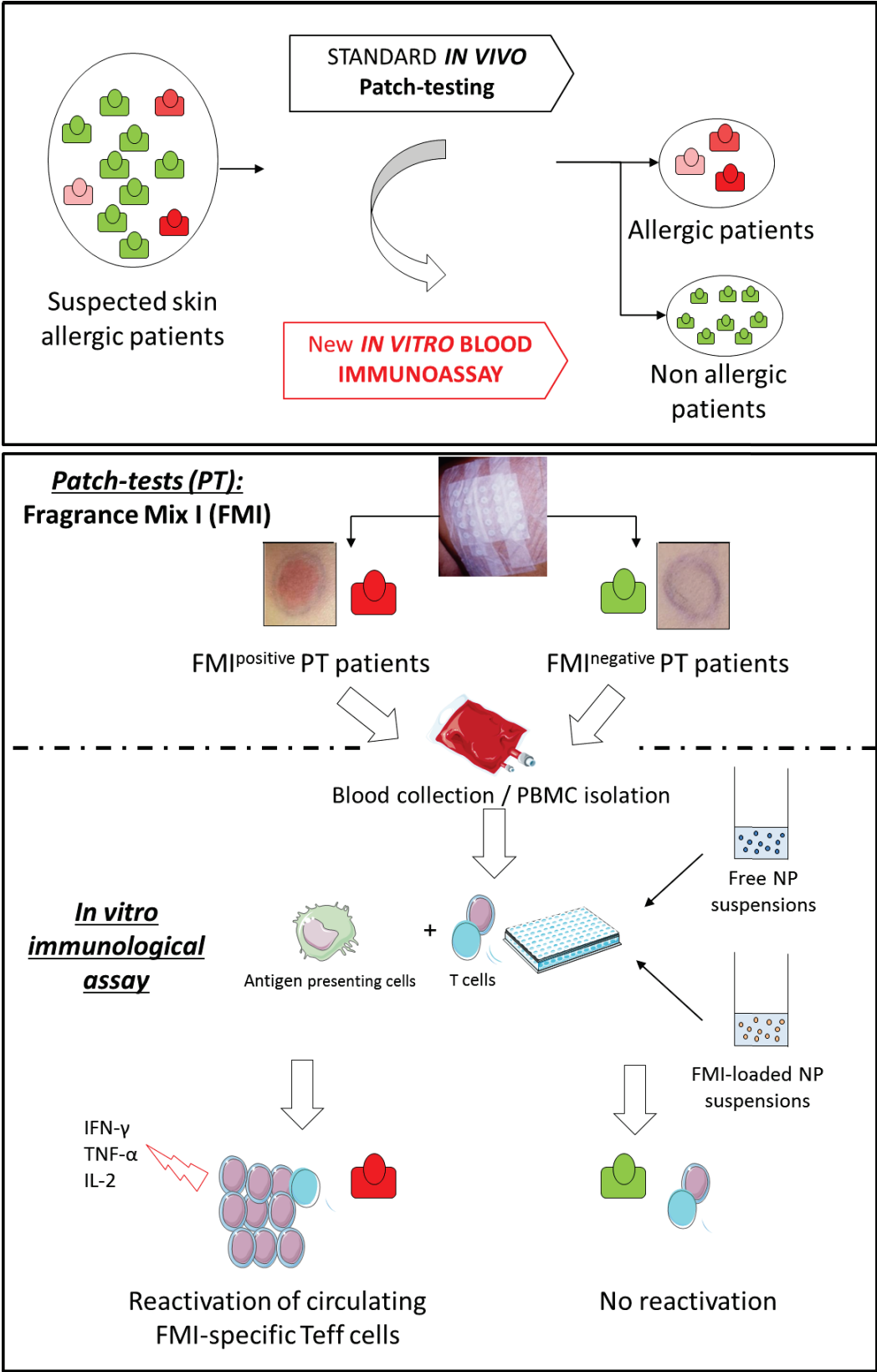
Tel :+33 437 28 23 48; e-mail address: marc.vocanson@inserm.fr

Author Disclosure Statement: The authors declare no competing financial/statement interests.

Abbreviations

ACD: Allergic Contact Dermatitis
EBS: European Baseline Series
FMI: Fragrance Mix 1
GC: Gas Chromatography
mAb: monoclonal Antibody
NP: Nanoparticle
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells
PT: Patch-Tests
RPMIc: complete RPMI medium
SI: Stimulation Indices
Teff: Effector T cells

Graphical abstract : « FMI-loaded NPs allows for the *in vitro* immunobiological diagnosis of allergic contact dermatitis to fragrances »



Abstract

The diagnosis of allergic contact dermatitis (ACD) relies on *in vivo* patch-testing. *In vitro* immunological assays based on the characterization of circulating allergen-specific memory T cells represent a promising alternative to patch-testing. However, their development is hampered by the technical challenge of assessing hydrophobic allergens in serum-based assays.

In this study, we show that the encapsulation of Fragrance Mix 1 (FMI, a mixture of 8 hydrophobic allergens) into poly- ϵ -caprolactone nanoparticle (NP) vectors: (i) dramatically increases the solubilization of allergens in conventional cell culture media and (ii) allows for a robust *in vitro* reactivation of allergen-specific T cells in large numbers of fragrance allergic patients.

Therefore, the encapsulation of hydrophobic allergens into NP vectors opens new avenues to improve the *in vitro* immunobiological diagnosis of ACD.

Keywords: Allergic Contact Dermatitis, Diagnosis, Immunobiological assays, Fragrances, Poly- ϵ -caprolactone nanoparticles

Introduction

Allergic Contact Dermatitis (ACD) is the most prevalent skin inflammatory disease in many European countries^{1,2}. ACD is induced by the repeated contact of individuals with ubiquitous chemical allergens, called haptens. ACD is a delayed-type hypersensitivity reaction and is mediated by the recruitment and activation into the skin of allergen-specific effector T cells (Teff)³.

Currently the diagnosis of ACD relies on clinical investigations by patch testing with suspected haptens. The patch test (PT) method aims at reproducing the ACD lesions in sensitized patients by applying occlusive patches containing the suspected allergens to the patient's healthy skin⁴.

Immunobiological assays based on the detection of allergen-specific Teff cells (and/or Teff cell products) circulating into the blood of allergic patients proved a valuable alternative to PT. Previously, promising results were obtained with hydrophilic compounds, such as metals or dyes⁵⁻⁷. Nevertheless, so far the development of such *in vitro* approaches was hampered by the lack of solubility into conventional cell culture media of the majority of allergens that are responsible for ACD; which is key to restimulate blood leucocytes collected from suspected patients.

In this study, we capitalized on the unique properties of poly-ε-caprolactone nanoparticles (NPs) to improve the solubilisation of Fragrance Mix 1, a mixture of 8 hydrophobic fragrance allergens, into cell culture media, and to demonstrate the efficacy of immunobiological assays for the diagnosis of ACD to fragrances.

Methods

See Supplemental Methods for complete information.

Preparation of Fragrance Mix I-loaded nanoparticles

FMI-loaded NPs were prepared using a nanoprecipitation process^{8,9}. Free, i.e unloaded NPs were also prepared. NP mean size and size distribution were determined by light scattering measurements. The concentration of each fragrance ingredient loaded into NPs was assessed using gas chromatography (GC).

Solubilization assay into cell culture media

FMI preparations (as allergen-loaded NP suspensions or free allergen solutions) were mixed into complete RPMI medium (RPMIc). Fractions, collected 15 min after introduction and mixing, were dissolved in acetone and next analyzed by GC. The percentage of FMI or individual FMI ingredients solubilized into RPMIc were determined as: fragrance concentrations titrated by GC into fractions / fragrance concentrations into FMI preparations (also validated by GC).

Clinical study

A prospective clinical study was conducted to obtain PBMC from FMI-sensitized or non-sensitized subjects. Therein, 31 patients with clinical history of eczema were patch-tested with the European Baseline Series (EBS) (comprising FMI). Blood was collected before PT and PBMC were purified using standard Ficoll density gradient. The characteristics of each individual and PT results are reported in **Tab.1**.

Table 1: Clinical characteristics of patients and their response to FMI patch-testing.

F, female; M, male; PT, patch test. PT lesions were evaluated according to the ICDRG scoring: negative reaction (-); weak (nonvesicular) positive allergic reaction: erythema, infiltration and possibly papules (+); strong (vesicular) positive allergic reaction: erythema, infiltration, papules and vesicles (++); extreme positive allergic reaction; bullous reaction (+++).

Patient number	Sex/Age	Clinical symptoms	FMI PT result
1	F/59	Generalized eczema	+++
2	M/61	Generalized eczema	+++
3	F/58	Face and generalized eczema	++
4	F/34	Face and neck eczema	++
5	F/50	Face and neck eczema	++
6	F/51	Hand eczema	++
7	F/55	Glossodynia	++
8	F/51	Face and eyelid eczema	++
9	F/51	Eczema	++
10	F/60	Hand and forearm eczema	++
11	M/61	Hand eczema	++
12	M/64	Generalized eczema	++
13	F/42	Generalized eczema	++
14	M/79	Hand eczema	++
15	M/74	Eyelid eczema	+
16	F/49	Hand eczema	+
17	F/52	Face eczema	+
18	F/37	Forehead eczema	+
19	F/57	Eyelid eczema	+
20	F/70	Eczema	+
21	F/61	Angular stomatitis/ cheilitis, diffuse eczema	-
22	F/40	Facial erythema, scalp seborrheic dermatitis, friction hives	-
23	F/70	Leg and forearm eczema	-
24	F/32	Eczema	-
25	F/42	Eczema	-
26	F/72	Erysipelas	-
27	M/39	Atopic dermatitis	-
28	F/38	Hand eczema	-
29	M/72	Hand eczema	-
30	F/24	Atopic dermatitis	-
31	F/73	Eczema	-

Immunobiological assays for the in vitro diagnosis of ACD

PBMC were cultured with graded amounts of FMI-loaded or free NPs for 5 days. Final concentrations of FMI introduced in each culture varied from 0.01 to 250µg/mL.

Secondary T cell proliferation and cytokine secretion into culture supernatant were evaluated by radioisotope incorporation and a multiplex Elisa assay respectively.

Results

NP encapsulation of FMI allergens increases their solubility in culture medium

FMI, composed of 8 hydrophobic allergens (cinnamyl alcohol, cinnamal, hydroxycitronellal, amyl cinnamal, geraniol, eugenol, isoeugenol and oak-moss absolute), was encapsulated into poly-ε-caprolactone NP vectors according to a solvent displacement method. This nanoprecipitation process was optimized to obtain NPs with mean size <200nm and polydispersity index <0.15. The global encapsulation efficiency proved >50%, but varied for each FMI individual ingredient, ranging from 10% (hydroxycitronellal) to >90% (oak-moss) (Cortial *et al.*, manuscript submitted).

In contrast to free hydrophobic allergens, which formed a creaming or sedimentation layer when dissolved into conventional cell culture medium, allergen-loaded NPs were homogeneously dispersed due to brownian motion. We then measured the solubilization rate of free- and encapsulated-FMI (or FMI individual ingredients) into RMPIc. Solubility percentages at 37°C, measured by GC, ranged from 40% to >90% when encapsulated into NP vectors, while it proved <30% for all the free compounds (**Fig.1**).

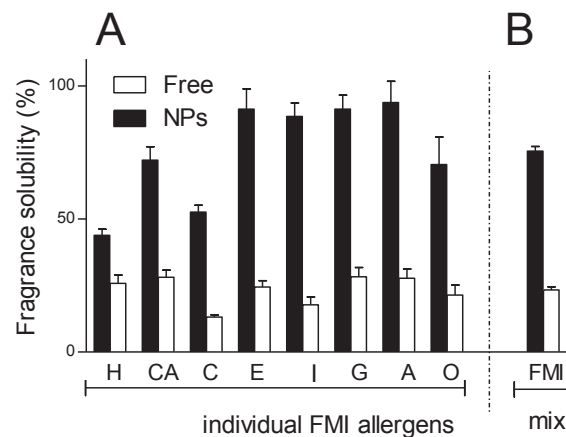


Fig.1: Increased solubilization of allergens and FMI into RPMI when encapsulated into poly-ε-caprolactone nanoparticles (NPs). (A) Percentage of the 8 individual fragrance allergens encapsulated in NPs vs. free allergen, solubilized into RPMIc at 37°C, measured by GC analysis and (B) determination of the solubility of the mix of the 8 allergens (FMI). Results are the mean of six measurements of three samples. H: hydroxycitronellal, CA: cinnamyl alcohol, C: cinnamal, E: eugenol, I: isoeugenol, G: geraniol, A: (α)-amylcinnamaldehyde, O: oak-moss, FMI: Fragrance Mix I. See details of solubility calculations in Table S3.

NP-encapsulated FMI activates allergen-specific T cells in vitro

We next assessed the interest of NP encapsulation of FMI for *in vitro* immunological diagnosis of ACD to fragrances. We enrolled a cohort of 31 patients with clinical history of ACD that were patch-tested with FMI and other contact allergens of the EBS. PBMCs were recovered from patients with positive (n=20) and negative FMI PT (n=11) and cultured for 5 days with graded doses of FMI-loaded and free NPs. Reactivation of FMI-specific memory T cells was assessed by: (i) proliferation assays using [H3]thymidine incorporation; (ii) cytokine secretion assays in the culture supernatant using multiplex Elisa.

FMI-loaded, but not free NPs, induced a significant and dose-dependent T cell proliferation in 10/20 patients with positive FMI PT (FMI^{pos}PT) (**Fig.2&3, supplementary Tab.S1**). By contrast, no proliferation was recorded in patients with negative PT (FMI^{neg}PT) (**Fig.2&3, supplementary Tab.S1**). We recorded mainly type-1 (IFN-γ, TNF-α) cytokine secretion in FMI^{pos}PT, and to a lesser extent type-2 (IL-5) cytokine secretion. IL-4 or IL-17A

secretions were recorded in rare patients only (**Fig.3, supplementary Tab.S2**). Of note, a clear correlation between proliferation and cytokine secretion was observed.

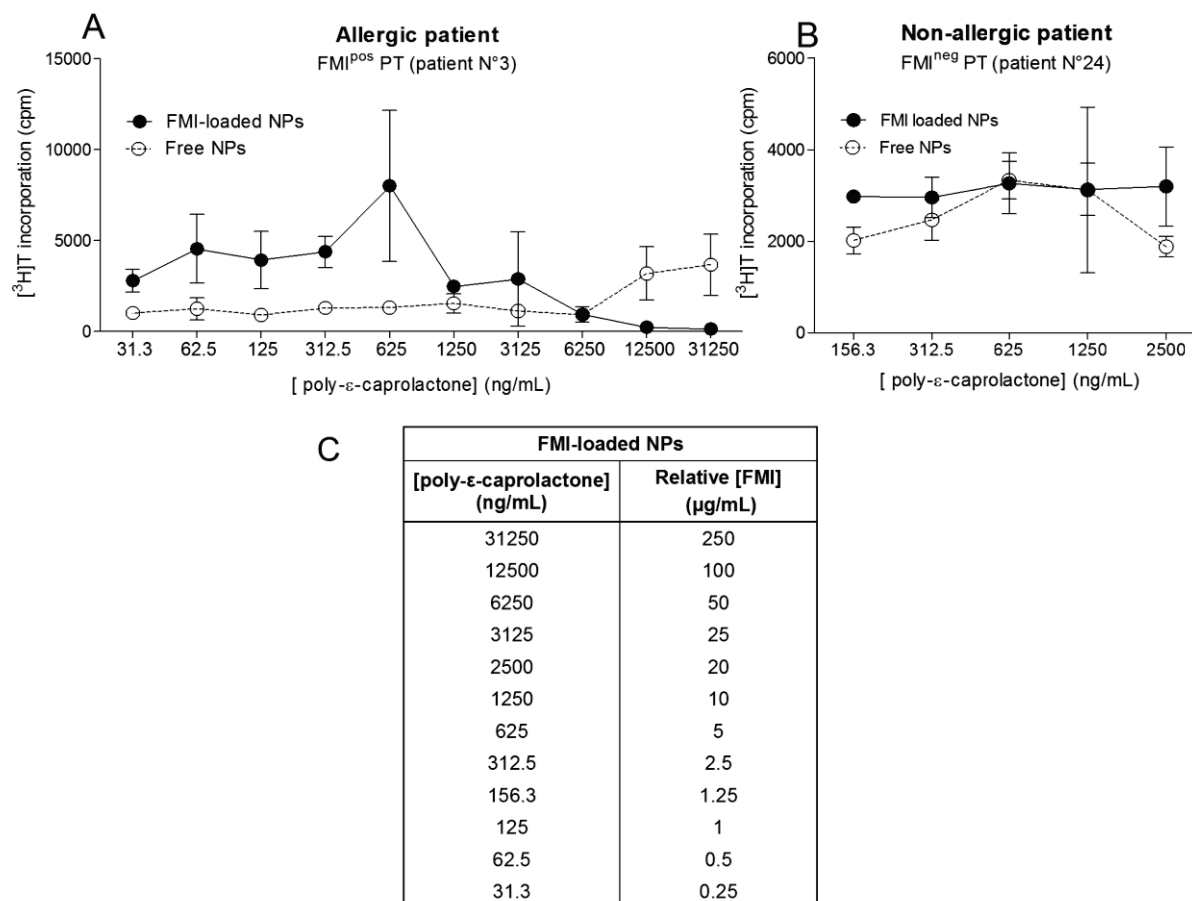


Fig.2: *In vitro* T cell response to FMI. Dose-dependant lympho-proliferation recorded in two patients representative of the cohort. PBMC (2×10^5) of two patients with FMI^{pos}PT (patient 3) (A) or FMI^{neg}PT (patient 24) (B) were cultured for 5 days with graded doses of FMI-loaded or free NPs (indicated as poly-ε-caprolactone concentrations). Proliferative responses were assessed by [³H]Thymidine incorporation for the last 15hrs of culture. Results represented mean value \pm SD. (C) Correlations between the concentrations of ε-caprolactone polymers in FMI-loaded NP suspensions and the relative FMI concentrations added into cultures.

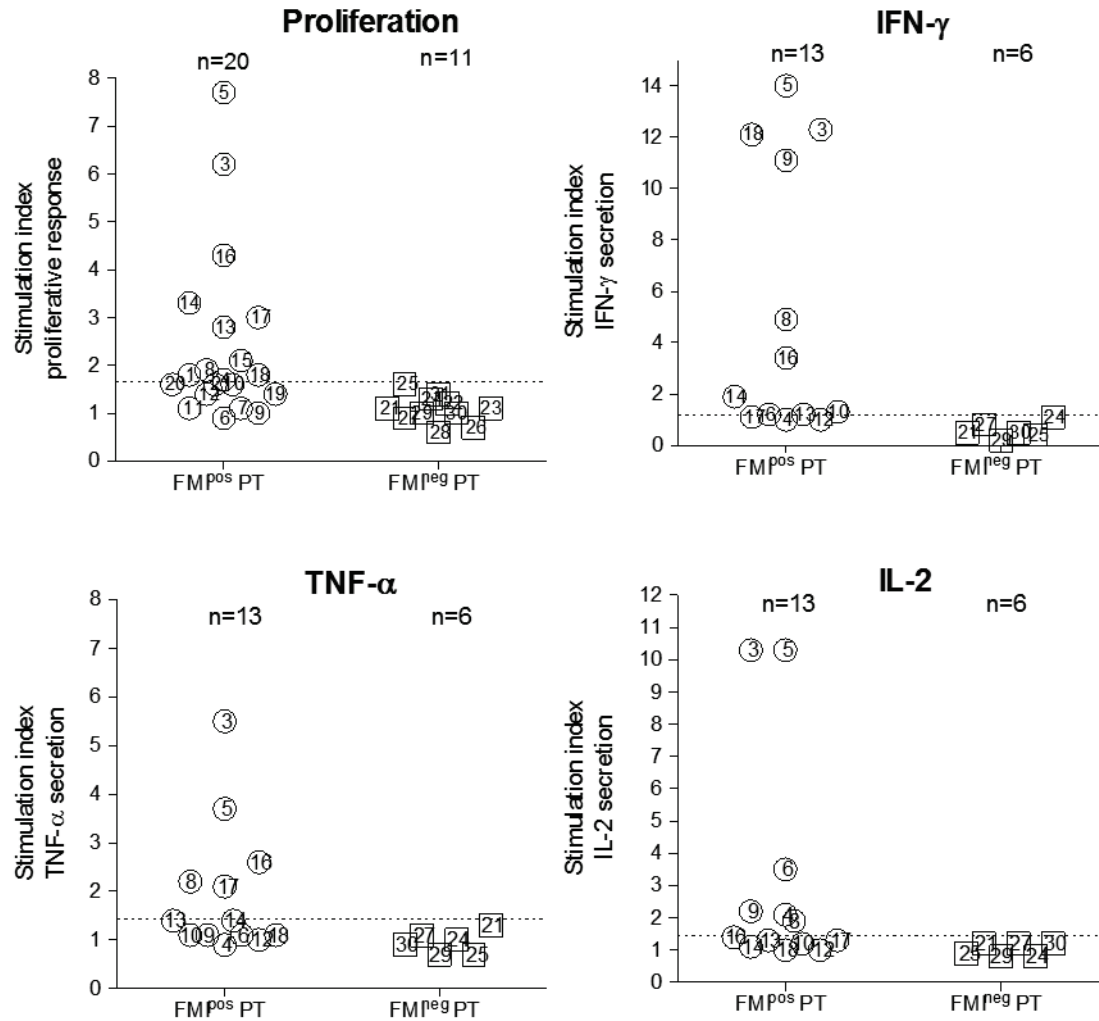


Fig.3: *In vitro* T cell response to FMI. Maximal stimulation indices for proliferation and cytokine secretion read-outs. PBMC (2×10^5) of patients with FMI^{pos}PT or FMI^{neg}PT were cultured for 5 days with graded doses of FMI-loaded or free NPs. Stimulation indices (SI) were calculated by dividing values recorded in FMI-loaded NP cultures to values recorded into control free NP cultures, at respective concentrations of poly-ε-caprolactone. Results depict maximal SI per individual for both proliferation (20 FMI^{pos}PT and 11 FMI^{neg}PT patients) and cytokine (IFN-γ, TNF-α, IL-2) (13 FMI^{pos}PT and 6 FMI^{neg}PT patients) secretion readouts. Results were considered positive when SI exceeded a threshold value corresponding to “the mean of SI for the FMI^{neg}PT group + 2 x SD” (dashed line).

Discussion

In this study, we report that NPs are an innovative solution to improve the solubilization of hydrophobic molecules in culture medium allowing the characterization of circulating allergen-specific T cells in ACD to fragrances. We showed that poly- ϵ -caprolactone NPs significantly limit molecule partitioning and enhance their solubility into conventional culture media. As a result, we observed that molecule uptake by PBMC subsets (monocytes, B cells and T cells) was significantly augmented when using NP vectors versus free molecules (**supplementary Fig.S1&S2**). This explains why memory T cells were efficiently stimulated *in vitro*. In other work, we reported that improved chemical uptake using NP vectors significantly boosted the maturation and stimulatory properties of monocyte-derived dendritic cells that are used for the development of a primary sensitization assay to screen chemical allergens (Achachi *et al.*, manuscript submitted).

The results described here address the sensitivity of the immunological assays used for the diagnosis of ACD to fragrances, as half of the patients with positive PT to FMI were negative in the immunological assay. Several reasons can explain the discrepancy between the positive skin PT and the negative immunological assays:

- (i) misinterpretation of PT readings; the PT results may be false positives. Indeed, chemicals applied under occlusion for 48hrs can sometimes cause non-allergic irritant contact dermatitis. Such reactions are often difficult to distinguish from ACD by visual analysis only¹⁰;
- (ii) insufficient quantities of FMI solubilized into culture and accessible to T cells. FMI is a mixture of 8 compounds and their encapsulation rate into NPs varies depending on their physicochemical properties (Cortial *et al.*, manuscript submitted). Hence, depending on the molecules to which patients are sensitized, the amount of the respective chemical solubilized into *in vitro* cultures may be too low to achieve an effect. Additionally, increasing the dose of FMI also increases toxicity, so the dose necessary to stimulate allergen-specific T cells in the immunological assays may not have been reached.

To overcome this problem, we are currently improving the engineering of poly-ε-caprolactone NP vectors to reach an encapsulation rate of >90% for all FMI ingredients. It will be interesting to determine whether these new NP vectors further improve *in vitro* T cell responses to FMI.

In conclusion, the present study suggests that the encapsulation of hydrophobic allergens/mixtures into NP vectors represents a promising approach to improve the immunobiological diagnosis of ACD, offering a valuable and complementary *in vitro* alternative to *in vivo* patch-testing.

Acknowledgments

We thank C.F.Godefroy, N.Gilmour (Unilever R&D, Vlaardingen, Netherlands), M.Elbaz (Chanel, Neuilly-sur-seine, France) G.Ellis (Givaudan, Vernier, Switzerland), B.Smith (Firmenich, Meyrin, Switzerland) and D.Tennstedt (Cliniques Universitaires Saint-Luc, Belgique) for their support in the realization of this work.

We also thank T. Andrieu, C.Bella and S. Dessurgey (Plateau technique de cytométrie en flux, UMS3444/US8 BioSciences Gerland - Lyon Sud) for their assistance with ImageStream X equipment.

References

- 1-M. Peiser, T. Tralau, J. Heidler, A. M. Api, J. H. Arts, D. A. Basketter, *et al.*, **Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, *in vitro* methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany.** *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:763-81
- 2-T. L. Diepgen, **Occupational skin-disease data in Europe.** *Int Arch Occup Environ Health.* 2003;76:331-8
- 3-M. Vocanson, A. Hennino, A. Rozieres, G. Poyet and J. F. Nicolas, **Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis.** *Allergy.* 2009;64:1699-714
- 4-V. Mahler, J. Geier and A. Schnuch, **Current trends in patch testing - new data from the German Contact Dermatitis Research Group (DKG) and the Information Network of Departments of Dermatology (IVDK).** *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014;12:583-92

- 5-B. Summer, C. Paul, F. Mazoochian, C. Rau, M. Thomsen, I. Banke, *et al.*, **Nickel (Ni) allergic patients with complications to Ni containing joint replacement show preferential IL-17 type reactivity to Ni.** *Contact Dermatitis*. 2010;63:15-22
- 6-M. Kneilling, U. Caroli, C. Grimm, J. Fischer, M. Eichner, T. Wieder, *et al.*, **Para-phenylenediamine-specific lymphocyte activation test: a sensitive *in vitro* assay to detect para-phenylenediamine sensitization in patients with severe allergic reactions.** *Exp Dermatol*. 2010;19:435-41
- 7-E. M. Coulter, C. Jenkinson, J. Farrell, S. N. Laverne, C. Pease, A. White, *et al.*, **Measurement of CD4+ and CD8+ T-lymphocyte cytokine secretion and gene expression changes in p-phenylenediamine allergic patients and tolerant individuals.** *J Invest Dermatol*. 2010;130:161-74
- 8-S. M. D'Addio and R. K. Prud'homme, **Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation.** *Adv Drug Delivery Rev*. 2011;63:417-26
- 9-H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury and S. Benita, **Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement.** *Int J Pharm*. 1989;55:R1-R4
- 10-A. Nosbaum, M. Vocanson, A. Rozieres, A. Hennino and J. F. Nicolas, **Allergic and irritant contact dermatitis.** *Eur J Dermatol*. 2009;19:325-32

Supplemental Methods

Preparation of Fragrance Mix I-loaded nanoparticles

NPs were prepared by using the nanoprecipitation technique. First, 25 mg of poly- ϵ -caprolactone powder (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was dissolved in 25 mL acetone at 40°C (organic phase). After cooling, 200mg (8mg/mL) of Fragrance mix I (FMI) (composed of 25 mg cinnamyl alcohol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 25 mg cinnamal (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, États-Unis), 25mg hydrocycitronellal (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 25 mg amyl cinnamal (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 25mg geraniol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 25 mg eugenol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 25mg isoeugenol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and 25 mg oak-moss absolute (Parfum Cosmetic World, Grasse, France) was added in organic phase. Secondly, 25 mg of polysorbate 80 (Croda, Snath Goole, UK) was dissolved in 50 mL of distilled water (aqueous phase). Then, the organic phase was dripped into the aqueous phase under magnetic stirring at 600 rpm. NPs formed instantaneously by diffusion of acetone in the aqueous phase. Acetone was then removed by evaporation under reduced pressure (100 mbar) at 40°C (BüchiRotavapor R-124) until a final volume of 50 mL was reached. The method was developed in preliminary experiments and it was proved that acetone removal did not alter the NP properties. Stock FMI-loaded NP suspensions were then sterilized by filtration through 0.2 μ m syringe filter (Minisart, Sartorius, Aubagne, France) and stored at 4°C for 1 month. Stock free NP suspensions were prepared in parallel, with the same protocol without fragrance addition. The mean size and size distribution were determined by light scattering measurements (Malvern® Zetasizer Nanoserie) performed in triplicate.

Fragrance quantification by gas chromatography

Fragrance quantification in FMI-loaded NP suspensions was performed by GC with flame ionization detector (GC-FID). Analysis was carried out using Shimadzu instrument GC 2010 plus equipped with split/splitless injector and capillary column Equity-5™ (30 m x 0,25 µm, 0.25 µm film thickness) conditioned at 300°C for 30 min before use. The carrier gas was helium (He) at a constant flow rate of 1mL/min with a pressure of 100kPa. The FID detector temperature was maintained at 350°C. The sample volume injected was 2 µL. The injector was set at 220°C, with a split ratio of 50. For the fragrance analysis, the oven temperature was increased from 100°C to 190°C at 2.5°C/min. The total program time was 35 min. Only one component of Evernia prunastri (oak-moss) extract was analyzed. Fragrance retention times (min) were 11.4 min for geraniol, 12.3 min for cinnamal, 12.7 min for hydroxycitronellal, 13.5 min for cinnamyl alcohol, 15.6 min for eugenol, 19.7 min for isoeugenol, 28.6 min for α-cinnamal and 31.3 min for oak-moss absolute.

Determination of fragrance encapsulation efficiency

Fragrance concentrations in FMI-loaded NP suspensions were determined by dissolving 50 µL of NP suspensions in 1 ml of acetone and quantifying individual FMI ingredients in this solution by gas chromatography (GC). FMI concentration was calculated as the average of the 8 FMI ingredient concentrations determined by GC. In parallel, 1 mL of NP suspensions was centrifuged at 14,000 rpm for 30min to separate the NPs. 500µL of supernatant was taken off and mixed with 500 µL of acetone. GC assay of this solution gave the concentrations of non-encapsulated fragrances, free in the dispersant phase. The encapsulation efficiency percentage (EE) was then determined as follows:

$$EE (\%) = ((\text{Concentrations of fragrances in FMI-loaded NP suspension} - \text{concentrations of fragrances free in the dispersant phase}) / \text{Concentrations of fragrances in FMI-loaded NP suspension}) \times 100$$

Clinical study

Clinical study was conducted at the Cliniques Universitaires Saint-Luc, UCL, Bruxelles, Belgique, in accordance with the Declaration of Helsinki and guidance on Good Clinical Practice (CPMP/ICH/135/95). Study protocols were reviewed and approved by independent ethic committees, and informed written consents were obtained from all study participants. No patient used any immunosuppressive medications during the time of the study.

All patch-tests (PT) were applied on the top of the back. To analyze FMI reactivity, PT were performed using 8% of FMI dispersed into petrolatum (1% cinnamyl alcohol, 1%

cinnamal, 1% hydroxycitronellal, 1% amyl cinnamal, 1% geraniol, 1% eugenol, 1% isoeugenol and 1% of oak-moss absolute), and 5% sorbitansesquiolate was used as emulsifier (Chemotechnique Diagnostics, Vellinge, Sweden). Allergens were applied using 8 mm Finn Chambers (SmartPractice, Phoenix, Arizona) with Micropore 3M tape. All patients were also exposed to the 28 other allergens of European Baseline Series. PT readings were performed at 72 hrs. The clinical scores of PT lesions were evaluated according to recommendations of the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG).

In vitro immunological assays

PBMCs were isolated from patient's blood by sequential density centrifugation on Ficoll-Hypaque (Eurobio, Paris, France) and distributed in triplicate in 96 round-bottom microwell plates (2.10^5 /well), in medium supplemented with 10% autologous serum in the presence or absence of chemicals.

Patient's PBMC (2.10^5 /well) were cultured with graded amounts (indicated as concentrations of ϵ -caprolactone polymers) of FMI-loaded or free NPs for 5 days, at 37°C, 5% CO₂. Control cultures were incubated with anti-CD3 mAbs (OkT3, 1 μ g/mL) for 2 days.

To assess secondary T cell proliferation, 1 μ Ci [³H]thymidine was added to each well for the last 15 hours of culture. [³H]thymidine incorporation was then measured using a beta counter Top Count (PerkinElmer, Boston, USA).

To assess cytokine production, IL-2, IL-4, IL-5, IL-17a, IFN- γ and TNF- α were measured using a multiplex assay, the human high sensitivity 6 plex from Millipore (Billerica, MA) and analyzed by axMAP® equipment (Multi-Analyte Profiling, Luminex Corp, USA). The supernatants of the cell culture triplicates were gathered and the experiments were performed in duplicates. Samples and antibody-immobilized beads were incubated overnight. Samples with values lower than the detection limit (Mean +2 SD) were assigned with an arbitrary value of 3 pg/mL.

Analysis of fluorescent dye uptake by PBMCs using epifluorescence microscopy

PBMCs were isolated from healthy donors (Etablissement Français du Sang, Lyon, France) by sequential density centrifugation on Ficoll-Hypaque (Eurobio, Paris, France). PBMCs (10^6 cells) were exposed during 24 h at 37°C, 5% CO₂, with 25 μ g/mL of free fluorescein isothiocyanate (FITC) or FITC-loaded NPs. NPs were prepared with the standard protocol described previously. A control without FITC was also prepared. After three washes,

cells were resuspended in RPMIc and seeded in 24-well plates (Multiwellst TM 24 well, Falcon, USA) containing Poly L-lysine pre-coated coverslips for 2 hours at 37°C, 5% CO₂. Cells were washed three times with PBS and fixed for 20 min with a solution of PBS 2% paraformaldehyde (PFA). After three washes, a solution of 100 µg/mL DAPI 4',6'-diamidino-2-phenylindole (Dihydrochloridev, Invitrogen, Life Technologies, Carisbad, CA, USA) was added for 5 min. Coverslips containing labelled PBMCs were then removed from the plate, assembled on microscope slide using 5 µL Fluoromount (Sigma-Aldrich). Analyses were performed with epifluorescence Axioskop (Zeiss, Oberkochen, Germany), equipped with a digital Axiocam Camera (Zeiss). Co-localisation analysis and cell fluorescence semi-quantification were performed with ImageJ software.

Analysis of fluorescent dye uptake by PBMCs using an ImageStream X equipment

PBMCs (10⁶ cells) from healthy donors were exposed with 25µg/mL free FITC or FITC-loaded NPs for 15min at 37°C, 5% CO₂. A control without FITC was also prepared. After three washes, cells were stained with anti-CD19-PE (Phycoerythrin), anti-CD3-APC (Allophycocyanin) and anti-CD14-PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanine 7) mAbs during 20min at 4°C. After washing, DAPI was used to stain the cell nuclei. Analyses were performed with ImageStream X (Phenocam, USA) equipped with 4 lasers. Compensation fluorescence overlap was calculated from singly labelled controls using IDEAS Amnis software.

Supplementary figure & Table legends

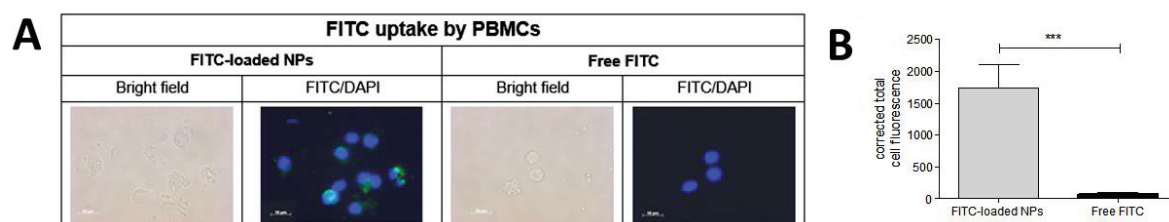


Fig.S1. Encapsulation of the green fluorescent dye FITC into nanoparticles significantly improves molecule uptake by PBMC. PBMC from healthy individuals were cultured with FITC-loaded NPs or free FITC for 24hrs, and next stained with DAPI to label cell nuclei. Cell morphology and FITC (green) /DAPI (blue) fluorescence were visualized using an Axioskop epifluorescence microscope, equipped with a digital Axiocam Camera. Results depict cell morphology observed in bright field, and FITC/DAPI co-labelling using ImageJ software (**A**). To semi-quantify cell fluorescence in FITC-loaded NPs or free FITC preparations, corrected total cell fluorescence was measured as subtraction of integrated density in fluorescent cells versus background (**B**). Integrated density represents mean pixel (brightness) values x selected area.

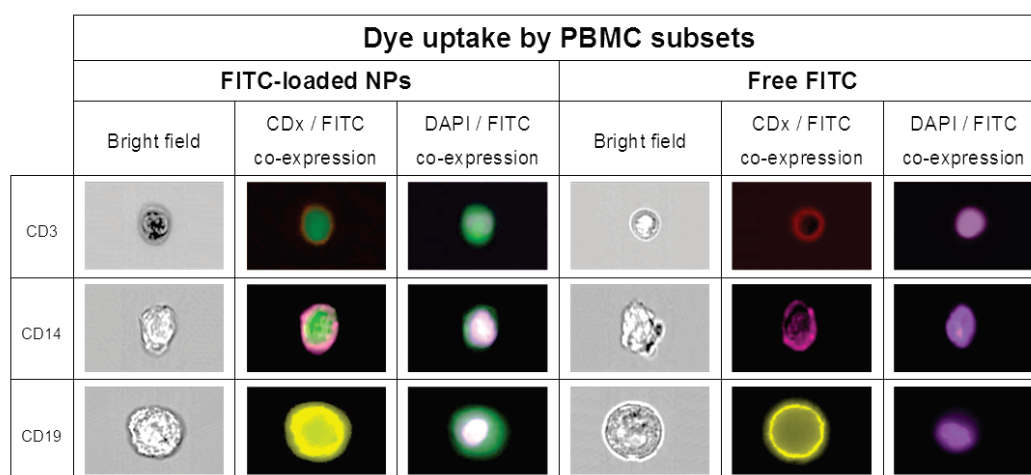


Figure S2. FITC-loaded NPs are internalized in different PBMC subsets. PBMC from healthy individuals were cultured with the fluorescent dye FITC, either as FITC-loaded NPs or free FITC, for 15min. Cells were next stained with fluorescent mAbs to cell surface PBMC molecules (CDx), and with DAPI (blue) to label cell nuclei. Cell labelling was analysed using an Image Stream X equipment. Results depict cell morphology observed in blank light (bright field), CDx/FITC and DAPI/FITC co-labelling. They show that both T (CD3, red), monocyte (CD14, purple) and B (CD19, yellow) cell subsets have engulfed FITC-loaded NPs.

Table S1: *In vitro* FMI-induced T cell proliferation. Patients' PBMC (2×10^5) were cultured for 5 days with graded doses of FMI-loaded or free NPs. In some control cultures, PBMCs were left unstimulated and/or activated with 1 μ g/ml anti-CD3 mAbs. Proliferative responses were assessed by [3 H]thymidine incorporation for the last 8hrs of culture. Maximal secondary T cell proliferations (mean value \pm SD) at respective poly- ϵ -caprolactone concentrations in NP suspensions are shown. Maximal stimulation indices, calculated according the following formula: "Proliferation recorded into FMI-loaded NP cultures / Proliferation recorded into free NP cultures", are also depicted.

	Patient number	[poly- ϵ -caprolactone] (ng/mL)	3[H] thymidine incorporation (cpm \pm SD)				Stimulation Index
			PBMCs pulsed with FMI loaded NPs	PBMCs pulsed with free NPs	Non-pulsed PBMCs	PBMCs + anti-CD3 mAb	
FMI ^{pos} PT	1	1250	3249 (\pm 1790)	1840 (\pm 477)	2177(\pm 616)	68155 (\pm 8653)	1,8
	2	625	8787 (\pm 1296)	5612 (\pm 1303)	6442 (\pm 1734)	16593 (\pm 553)	1,6
	3	625	8003(\pm 7221)	1297(\pm 207)	4288 (\pm 1149)	9676 (\pm 3894)	6,2
	4	1250	37739 (\pm 11613)	20467 (\pm 10167)	24586 (\pm 3825)	32158 (\pm 5199)	1,7
	5	1250	2407 (\pm 837)	312(\pm 142)	246 (\pm 36)	2508 (\pm 656)	7,7
	6	312.5	3542 (\pm 1661)	33931 (\pm 1368)	2898 (\pm 1181)	31859 (\pm 4831)	0,9
	7	625	5088 (\pm 2113)	4842 (\pm 2433)	4504 (\pm 222)	38701 (\pm 2796)	1,1
	8	125	7884 (\pm 6383)	4516 (\pm 2633)	3623 (\pm 865)	9008 (\pm 1935)	1,9
	9	1562.5	17795 (\pm 1147)	16930 (\pm 1711)	9763 (\pm 2732)	9676 (\pm 3894)	1,0
	10	100	3274 (\pm 1350)	2025 (\pm 211)	1404 (\pm 281)	4191 (\pm 1485)	1,6
	11	62.5	6669 (\pm 1184)	6140 (\pm 2424)	3586 (\pm 1598)	38700 (\pm 2796)	1,1
	12	200	2315 (\pm 712)	1948 (\pm 281)	1395 (\pm 713)	20572 (\pm 1140)	1,4
	13	3125	10011 (\pm 1712)	3772 (\pm 864)	3696 (\pm 470)	17338 (\pm 1771)	2,8
	14	312.5	8401 (\pm 1428)	2513 (\pm 781)	1111 (\pm 404)	2608 (\pm 1034)	3,3
	15	625	466 (\pm 200)	226(\pm 77)	243 (\pm 37)	2926 (\pm 1742)	2,1
	16	31.3	13255 (\pm 4664)	5191 (\pm 2542)	7200 (\pm 978)	12344 (\pm 3845)	4,3
	17	125	5456 (\pm 1531)	2789 (\pm 1225)	2400 (\pm 231)	12200 (\pm 710)	3,0
	18	156.3	3996 (\pm 328)	2320 (\pm 905)	2814 (\pm 1428)	4088 (\pm 1762)	1,8
	19	5	7169 (\pm 2346)	5008 (\pm 3855)	2415 (\pm 459)	2655 (\pm 958)	1,4
	20	10	3696 (\pm 1457)	2336 (\pm 240)	3339 (\pm 1195)	17632 (\pm 4213)	1,6
FMI ^{neg} PT	21	625	15035 (\pm 1929)	13097 (\pm 4577)	1644 (\pm 170)	12373 (\pm 7679)	1,1
	22	400	1101 (\pm 600)	955 (\pm 388)	450 (\pm 124)	1485 (\pm 53)	1,2
	23	3125	253 (\pm 14)	224 (\pm 15)	480 (\pm 192)	4550 (\pm 974)	1,1
	24	312.5	2225 (\pm 304)	1746 (\pm 384)	1052 (\pm 557)	9196 (\pm 6494)	1,3
	25	38.8	328 (\pm 110)	526 (\pm 330)	134 (\pm 37)	420 (\pm 159)	1,6
	26	312.5	281 (\pm 109)	424 (\pm 148)	388 (\pm 19)	11475 (\pm 8635)	0,7
	27	312.5	9580 (\pm 1320)	10932 (\pm 394)	9525 (\pm 1421)	11394 (\pm 1864)	0,9
	28	312.5	1884 (\pm 394)	3195 (\pm 1495)	1785 (\pm 511)	34840 (2499)	0,6
	29	625	2465 (\pm 757)	3264 (\pm 1154)	2030 (\pm 600)	7730 (\pm 3866)	1,0
	30	156.3	3824 (\pm 1034)	3805 (\pm 512)	3593 (\pm 914)	46245 (\pm 10791)	1,0
	31	1250	304 (\pm 107)	222 (\pm 69)	5847 (\pm 381)	39250 (\pm 4345)	1,4

Table S2: *In vitro* FMI-induced cytokine secretion. Patients' PBMC (2×10^5) were cultured for 5 days with graded doses of FMI-loaded or free NPs. At the end of culture, supernatants were recovered and tested for the presence of IFN- γ , TNF- α , IL-2 (**A**) and IL-4, IL-5 and IL-17A (**B**), by multiplex Elisa. Results represent the mean value \pm SD, at respective poly- ϵ -caprolactone concentrations. Stimulation indices, calculated according the following formula: "Cytokine secretion into FMI-loaded NP cultures / Cytokine secretion recorded into free NP cultures" are also shown.

A

	Patient number	[poly- ϵ -caprolactone] (ng/mL)	IFN- γ secretion (pg/mL)			TNF- α secretion (pg/mL)			IL-2 secretion (pg/mL)		
			PBMCs pulsed with FMI loaded NPs	PBMCs pulsed with free NPs	Stimulation index	PBMCs pulsed with FMI loaded NPs	PBMCs pulsed with free NPs	Stimulation index	PBMCs pulsed with FMI loaded NPs	PBMCs pulsed with free NPs	Stimulation index
FMI ^{pos} PT	3	625	37.04 (± 7.15)	3.00 (± 1.00)	12.3	35.75 (± 2.31)	6.48 (± 0.19)	5.5	22.49 (± 4.37)	2.19 (± 0.11)	10.3
	4	625	2185.5 (± 273.8)	2197.5 (± 117.9)	1.00	347.59 (± 10.59)	386.52 (± 89.18)	0.9	71.28 (± 10.66)	33.60 (± 2.18)	2.1
	5	1250	42.10 (± 31.98)	3.00 (± 1.00)	14.0	11.35 (± 10.44)	3.10 (± 2.05)	3.7	13.83 (± 8.81)	1.35 (± 0.16)	10.3
	6	312.5	33.02 (± 7.97)	27.87 (± 4.97)	1.2	136.18 (± 36.41)	127.34 (± 18.69)	1.1	10.42	3.00 (± 1.00)	3.5
	8	312.5	56.04 (± 6.17)	11.41 (± 1.46)	4.9	165.71 (± 43.24)	74.8 (± 3.60)	2.2	20.51 (± 1.60)	10.67 (± 1.95)	1.9
	9	1562.5	624.35 (± 54.96)	56.04 (± 6.17)	11.1	234.76 (± 0.21)	211.39 (± 16.4)	1.1	41.34 (± 2.89)	19.56 (± 2.66)	2.1
	10	125	237.25 (± 6.53)	186.12 (± 5.12)	1.3	185.47 (± 28.55)	165.31 (± 28.25)	1.1	48.04 (± 1.74)	41.8 (± 7.37)	1.2
	12	200	3.00 (± 1.00)	3.00 (± 1.00)	1.0	3.00 (± 1.00)	3.00 (± 1.00)	1.0	3.00 (± 1.00)	3.00 (± 1.00)	1.0
	13	3125	143.59 (± 20.65)	124.48 (± 4.19)	1.2	161.98 (± 8.81)	112.17 (± 59.41)	1.4	15.96 (± 1.49)	12.70	1.3
	14	312.5	86.93 (± 1.67)	44.63 (± 6.80)	1.9	137.83 (± 4.98)	97.485 (± 6.88)	1.4	13.93 (± 1.46)	12.78 (± 0.28)	1.1
	16	31.3	113.52 (± 5.50)	33.73 (± 4.10)	3.4	110.23 (± 2.69)	43.03 (± 16.67)	2.6	7.34 (± 0.21)	5.38 (± 1.16)	1.4
	17	125	87.65 (± 5.42)	82.83 (± 5.07)	1.1	193.30 (± 2.08)	92.98 (± 6.66)	2.1	11.67 (± 0.47)	8.68	1.3
	18	312.5	36.18 (± 1.83)	3.00 (± 1.00)	12.1	24.63 (± 1.48)	22.9 (± 2.40)	1.1	3.00 (± 1.00)	3.00 (± 1.00)	1.0
FMI ^{neg} PT	21	312.5	141.21 (± 6.27)	390.81 (± 15.97)	0.5	139.03 (± 29.72)	103.84 (± 13.92)	1.3	6.85 (± 0.41)	5.70 (± 1.75)	1.2
	24	312.5	805.11 (± 47.73)	729.29 (± 1.89)	1.1	3.00 (± 1.00)	3.00 (± 1.00)	1.0	43.26 (± 1.15)	51.52 (± 6.13)	0.8
	25	38.8	137.44 (± 146.31)	379.52	0.4	192.43 (± 9.09)	292.80 (± 4.59)	0.7	45.00 (± 3.89)	49.29 (± 1.33)	0.9
	27	625	1106.53 (± 124.6)	1402.35 (± 53.48)	0.8	210.62 (± 21.49)	192.32 (± 22.06)	1.1	34.07 (± 1.00)	29.53 (± 7.75)	1.2
	29	625	25.61 (± 2.93)	161.14 (± 1.87)	0.2	52.48 (± 1.29)	71.28 (± 3.10)	0.7	32.58 (± 2.11)	39.55 (± 0.38)	0.8
	30	156.3	12.92 (± 4.17)	26.59 (± 1.44)	0.5	19.75 (± 0.39)	21.60 (± 1.03)	0.9	7.40 (± 0.94)	6.29 (1.58)	1.2

B

	Patient number	[poly-ε-caprolactone] (ng/mL)	IL-4 secretion (pg/mL)			IL-5 secretion (pg/mL)			IL-17a secretion (pg/mL)		
			PBMCs pulsed with FMI loaded NPs	PBMCs pulsed with free NPs	Stimulation index	PBMCs pulsed with FMI loaded NPs	PBMCs pulsed with free NPs	Stimulation index	PBMCs pulsed with FMI loaded NPs	PBMCs pulsed with free NPs	Stimulation index
FMI ^{pos} PT	3	625	5.37 (±4.11)	3.11 (±1.10)	1.8	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0
	4	625	20.25 (±0.71)	31.69 (±3.13)	0.6	90.18 (±22.13)	128.83 (±52.9)	0.7	5.17 (±0.73)	28.82 (±0.96)	0.2
	5	1250	3.10 (±2.05)	11.35 (±10.4)	0.3	34.37 (±12.98)	3.00 (±1.00)	11.5	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0
	6	312.5	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0	3.00 (±1.00)	11.51 (±3.01)	0.3	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0
	8	312.5	4.78 (±2.02)	3.63 (±1.30)	1.3	16.24 (±6.29)	8.40 (±2.34)	1.9	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0
	9	1562.5	3.76 (±1.12)	4.87 (±1.12)	0.8	4.42 (±0.98)	11.92 (±0.74)	0.4	3.00 (±1.00)	8.86 (±2.09)	0.4
	10	125	15.97 (±3.61)	15.97 (±3.61)	1.0	67.43 (±3.59)	30.00 (±11.50)	2.3	11.89 (±0.76)	22.41 (±11.38)	0.5
	12	200	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0
	13	3125	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0	75.49 (±6.55)	29.82	2.5	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0
	14	312.5	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0
	16	31.3	9.12 (±1.89)	3.89	2.3	35.56 (±0.09)	7.74 (±2.32)	4.6	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0
	17	125	4.32 (±0.24)	3.80 (±1.22)	1.1	9.10	9	1	13.97 (±1.54)	3.00 (±1.00)	4.7
	18	312.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FMI ^{neg} PT	21	312.5	3.99 (±0.35)	5.18 (±2.21)	0.8	8.13 (±1.78)	11.48 (±0.69)	0.7	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0
	24	312.5	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0	58.20 (±3.85)	32.88 (±10.44)	1.8	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0
	25	38.8	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0	10.58 (±0.32)	16.73 (±0.50)	0.6	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0
	27	625	12.17 (±1.12)	24.95 (±10.85)	0.5	30.45 (±0.23)	43.5 (±2.28)	0.7	3.00 (±1.00)	7.27 (±1.44)	0.4
	29	625	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0	9.35 (±1.19)	26.06 (±0.79)	0.4	3.00 (±1.00)	33.66 (±2.14)	0.1
	30	156.3	4.32 (±0.24)	3.80 (±1.22)	1.1	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0	3.00 (±1.00)	3.00 (±1.00)	1.0

Table S3: Increased solubilization of allergens and FMI into RPMI when encapsulated into poly- ϵ -caprolactone nanoparticles (NP): Raw data (A) and estimation of the amount of chemicals present in NP fractions or free in the dispersant phase of allergen-loaded NP suspensions (B). Stock FMI preparations (as allergen-loaded NP suspensions or free allergen solutions), and RPMIc fractions collected 15 min after introduction of stock FMI preparations and mixing, were titrated by GC to determine cinnamyl alcohol, cinnamal, hydroxycitronellal, amyl cinnamal, geraniol, eugenol, isoeugenol and oak-moss absolute concentrations. FMI concentrations were calculated as the average of the 8 FMI ingredient concentrations determined by GC. Chemical solubility was then appreciated as the ratio of fragrance concentrations into RPMI fractions / fragrance concentrations in stock FMI preparations. Results depict the mean of six measurements of three samples. (A). Because encapsulation was not maximal and very different depending on the FMI ingredients, a more or less extensive amount of each chemical was present within NPs among allergen-loaded NP suspensions. A significant portion of fragrances stayed free in the dispersant phase of these suspensions. To estimate chemical concentrations within (i) NP fractions and (i) the dispersant phase of allergen-loaded NP suspensions, encapsulation efficiencies were multiplied to fragrance concentrations of stock FMI preparations assessed by GC. Results depict the mean of six measurements of three samples (B).

A

Fragrance allergens	Allergen-loaded NP suspension			Free allergen solution		
	Fragrance concentrations in RPMI fractions ($\mu\text{g/g}$)	Fragrance concentrations in stock FMI preparations ($\mu\text{g/g}$)	Fragrance solubility (%)	Fragrance concentrations in RPMI fractions ($\mu\text{g/g}$)	Fragrance concentrations in stock FMI preparations ($\mu\text{g/g}$)	Fragrance solubility (%)
Hydroxycitronellal	16.3 (\pm 0.8)	37,2 (\pm 1.2)	43.9 (\pm 2.3)	10.4 (\pm 1.3)	40.5 (\pm 0.9)	25.8 (\pm 3.1)
Cinnamyl alcohol	27.9 (\pm 2.0)	38,6 (\pm 3.6)	72.1 (\pm 5.0)	10.0 (\pm 1.0)	35.6 (\pm 1.2)	28.1 (\pm 2.7)
Cinnamal	18.4 (\pm 1.1)	35,1 (\pm 3.3)	52.6 (\pm 2.6)	4.9 (\pm 0.9)	37.3 (\pm 1.3)	13.1 (\pm 0.9)
Eugenol	27.0 (\pm 2.2)	29,6 (\pm 4.8)	91.3 (\pm 7.6)	7.4 (\pm 0.8)	30.1 (\pm 0.8)	24.4 (\pm 2.4)
Isoeugenol	28.8 (\pm 1.3)	32,6 (\pm 1.6)	88.5 (\pm 7.6)	5.3 (\pm 0.9)	29.6 (\pm 0.9)	17.8 (\pm 2.9)
Geraniol	36.1 (\pm 1.7)	39,5 (\pm 2.9)	91.3 (\pm 5.2)	10.3 (\pm 1.2)	36.4 (\pm 1.2)	28.3 (\pm 3.5)
(α)-amylcinnamaldehyde	32.9 (\pm 2.1)	35,1 (\pm 2.1)	93.7 (\pm 8.0)	8.2 (\pm 1.1)	29.7 (\pm 1.1)	27.8 (\pm 3.4)
Oak-moss	25.2 (\pm 2.8)	35,7 (\pm 3.2)	70.5 (\pm 10.5)	7.1 (\pm 1.3)	33.4 (\pm 1.3)	21.4 (\pm 3.8)
FMI (mean)	26.7 (\pm 2.3)	35,4 (\pm 3.7)	75.5 (\pm 1.8)	8.0 (\pm 2.3)	34.1 (\pm 4.1)	23.3 (\pm 1.2)

B

Fragrance allergens	Encapsulation efficiency (%)	Concentrations determined by GC (µg/g)	Fragrance concentrations in in stock FMI preparations (µg/g)	
			Estimation of NP fraction (µg/g)	Estimation of free fraction (µg/g)
Hydroxycitronellal	41.9 (±1.4)	37,2 (± 1.2)	21.6 (± 1.2)	15.6 (± 1.2)
Cinnamyl alcohol	33.7 (± 4.8)	38,6 (± 3.6)	13.0 (± 3.6)	25.6 (± 3.6)
Cinnamal	83.1 (± 4.6)	35,1 (± 3.3)	29.2 (± 3.3)	5.9 (± 3.3)
Eugenol	44.8 (± 6.4)	29,6 (± 4.8)	13.3 (± 4.8)	16.3 (± 4.8)
Isoeugenol	61.5 (±1.5)	32,6 (± 1.6)	20.0 (± 1.6)	12.6 (± 1.6)
Geraniol	50.3 (± 3.6)	39,5 (± 2.9)	19.9 (± 2.9)	19.6 (± 2.9)
(α)-amylcinnamaldehyde	98.5 (± 0.7)	35,1 (± 2.1)	34.6 (± 2.1)	0.5 (± 2.1)
Oak-moss	100 (± 0.1)	35,7 (± 3.2)	35.7 (± 3.2)	0.0 (± 3.2)
FMI (mean)	63.6 (± 2.4)	35,4 (± 3.7)	22.5 (± 3.7)	12.9 (± 3.7)

DISCUSSION - PERSPECTIVES

Les objectifs de ce travail étaient de développer de nouvelles nanoparticules répondant à des exigences précises en termes de nature, de distribution de taille et de surface, appliquées à la vectorisation simultanée de plusieurs molécules à travers la peau et au développement de tests immunobiologiques portant sur le diagnostic de l'EAC. Ainsi, pour répondre à ces objectifs, nous avons cherché à relever les challenges technologiques et à répondre aux questions suivantes :

(i) - Formulation de NPs organiques

- *Quels procédés (nanoprécipitation, émulsion – sonication, homogénéisation haute pression) choisir pour générer des NPs polymères (PCL-NPs) et lipidiques (SLNs) ?*
- *Quels sont les principaux paramètres de formulation (quantités de molécules à encapsuler, quantité de polymère, masse molaire du polymère...) impactant les caractéristiques intrinsèques (taille, PDI, EE%...) des nanoparticules générées ?*
- *Peut – on obtenir des NPs encapsulant simultanément un mélange (modèle du FMI) avec des taux d'encapsulation similaires ?*
- *Les propriétés physico-chimiques des constituants du mélange influencent-elles les caractéristiques intrinsèques des NPs générées ?*

(ii) - Vectorisation simultanée d'un mélange de molécules à travers la peau

- *La nature des nano-vecteurs (polymères, lipidiques, propriétés de surface) permet-elle de contrôler le ciblage et la libération de plusieurs molécules dans la peau ?*
- *Au delà du type de vecteurs, les propriétés intrinsèques des molécules encapsulées jouent-elles un rôle dans leur distribution à travers les différentes assises cutanées ?*
- *Est-il possible de visualiser des nanoparticules au sein du tissu cutané ?*

(iii) - Développement d'un nouveau test de diagnostic *in vitro* de l'eczéma allergique de contact aux parfums

- *L'utilisation de nano-vecteurs améliore-t-elle la solubilisation du FMI dans les milieux de culture usuels ?*
- *L'application des NPs encapsulant du FMI permet-elle de réactiver de manière robuste des lymphocytes T spécifiques circulants chez des patients allergiques aux parfums ?*

1. Les nanoparticules organiques, des outils d'innovation permettant l'encapsulation d'un mélange d'actifs

Au cours de ce travail, nous avons choisi d'utiliser les NPs, vecteurs considérés comme la forme galénique la plus adaptée pour répondre à nos objectifs. Ces systèmes devaient :

- (i) - être biocompatibles et stériles pour pouvoir être utilisés dans le domaine biomédical, nous avons choisi de formuler deux types de NPs organiques : (polymères et lipidiques) afin de réduire les risques de toxicité pour les tissus cutanés ou pour les cellules en culture *in vitro*.
- (ii) - présenter une taille inférieure à 200 nm avec un indice de polydispersité (PDI) < 0,2 pour nous permettre de stériliser les préparations par une méthode de filtration. En effet, réaliser l'ensemble de la formulation dans des conditions stériles n'était pas envisageable à l'échelle du laboratoire.
- (iii) - encapsuler un mélange de FMI pour étudier la vectorisation de plusieurs molécules à travers la peau ou développer notre test de diagnostic avec des taux d'encapsulation élevés

Pour générer de tels systèmes, nous avons procédé à l'étude précise de trois procédés qui sont la nanoprécipitation pour les NPs polymères, l'homogénéisation haute pression et l'émulsion-sonication pour les nanoparticules lipidiques.

1.1. L'encapsulation du fragrance mix I au sein de NPs polymères par nanoprécipitation est influencée par leur taux d'encapsulation et les propriétés intrinsèques de chaque molécule composant le mélange (Article 1)

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la nanoprécipitation pour le développement des NPs polymères. Ce protocole simple et reproductible est également appelé « déplacement de solvant » et a été introduit en 1989 par Fessi *et al.* pour encapsuler principalement des molécules hydrophobes dans des particules de taille comprise entre 100 et 300 nm (Morales-Cruz, 2012). Le poly-(ϵ -caprolactone) (PCL) a été choisi comme matériau matriciel constituant avec le poly-(lactic co glycolic acid) (PLGA), les deux polymères les plus utilisés dans le domaine pharmaceutique. Ces polymères biodégradables présentent toutes les caractéristiques requises pour le procédé de nanoprécipitation, possédant un point de fusion faible ($T_f = 58.1^\circ\text{C}$), et une bonne solubilité dans l'acétone. Ces polyesters sont de plus hydrophobes (Nanaki, 2011), et leur utilisation est approuvée par les

autorités réglementaires comme la Food and Drug Administration et l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (Almouazen, 2012).

- Quel polymère choisir pour préparer les nanoparticules polymères ?

Chermenko *et al.* étudiant la vitesse de dégradation et la toxicité des NPs de PCL et de PLGA sur des cultures cellulaires (HelaCells) par microscopie Raman, ont montré une dégradation du PCL plus lente que celle du PLGA dans les milieux de culture (Chernenko, 2009). Ces résultats ont été confirmés par Nanaki *et al.* sur des cellules ombilicales humaines, le PCL est dégradé par hydrolyse et les métabolites produits pour des concentrations inférieures à 1 g.mL⁻¹ ne sont pas toxiques. Dans ce contexte, nous avons donc décidé de travailler à partir de PCL présentant une vitesse de dégradation lente conduisant à la génération de métabolites non toxiques, et un coût plus faible que le PLGA. Une vitesse de dégradation lente est nécessaire pour permettre une meilleure internalisation des molécules encapsulées par les cellules d'intérêt dans notre test diagnostic.

- L'encapsulation individuelle de chaque molécule constituant le FMI entraîne-t-elle la formulation de nanoparticules de propriétés différentes ?

Avant d'aborder l'encapsulation du mélange FMI, nous nous sommes intéressés à l'encapsulation de chacun des 8 composés du mélange afin de déterminer les relations existantes entre les propriétés intrinsèques des NPs (distribution de taille, potentiel Zêta et taux d'encapsulation (EE%)) et les propriétés physico-chimiques (structure chimique et log P) de chacune des molécules étudiées.

L'ensemble des NPs obtenues ont présenté des tailles moyennes et des indices de polydispersité (PDI) respectivement inférieurs à 175 nm et 0,1. Ainsi, quel que soit le type de molécules encapsulées la taille est restée inférieure à 200 nm. Dans la littérature, Almouazen *et al.* et Khayata *et al.* ont formulé des NPs de PCL encapsulant respectivement du rétinol avec une taille de 180 nm et de la vitamine E dans des NPs de taille de 150 nm (Almouazen, 2009 ; Khayata, 2012). La taille semble donc être peu influencée par la molécule encapsulée et semble être régie par le procédé de nanoprécipitation.

Classiquement, les NPs de PCL présentent une charge électrique négative due à la présence des groupements carboxyliques terminaux. Dans notre étude, les NPs de PCL ont été stabilisées avec un tensioactif non ionique, neutralisant ainsi la charge de surface des particules (Einarson, 1993 ; Trimaille, 2003). Toutes les particules ont présenté un potentiel Zeta nul, quelle que soit la molécule encapsulée.

Contrairement aux deux paramètres précédents, le EE% s'est avéré différent en fonction des molécules étudiées. L'étude du taux d'encapsulation en fonction du log P de la molécule nous a permis d'établir une corrélation entre ces deux paramètres, montrant une plus grande affinité des molécules hydrophobes (log P élevé) avec le polymère de PCL (qui est également de nature hydrophobe). Nii *et al.* ont également mis en avant ce phénomène dans leur étude portant sur l'encapsulation de principes actifs dans des liposomes (Nii, 2005). Compte tenu de ces résultats, le log P semble être un bon indicateur pour prédire l'EE% dans des NPs de PCL, dans le cas de l'encapsulation d'une seule molécule. Cependant, le coefficient de partage n'est pas le seul paramètre lié au EE%, la structure chimique joue également un rôle important. Considérant deux molécules avec des log P voisins mais de structures chimiques différentes, comme l'eugénol (log P = 2,20) et le cinnamaldéhyde (log P = 2,12), le taux d'encapsulation dans les NPs de PCL s'est révélé très variable : 46% pour l'eugénol et 88% pour le cinnamaldéhyde. La présence de la fonction aldéhyde du cinnamaldéhyde, fonction réactive, a pu expliquer en partie cette différence de résultats.

- Quels sont les paramètres de formulation impactant les propriétés intrinsèques des NPs dans le procédé de nanopréciipitation ?

Les paramètres de formulation ont une influence majeure sur les propriétés intrinsèques des NPs de PCL. Afin de les étudier, nous avons sélectionné l'eugénol comme molécule modèle. En effet, ce dernier présente un log P moyen (2,20) par rapport aux autres molécules à encapsuler (compris entre 1,70 et 4,36).

Nous avons déterminé comment divers paramètres tels que (i) - la quantité d'eugénol, (ii) - la quantité de tensioactif, (iii) - la quantité de polymère, (iv) - la masse molaire du polymère, (v) - le ratio volumique de la phase aqueuse sur la phase organique, et (vi) - la composition de la phase aqueuse, impacte le taux d'encapsulation final de l'eugénol dans les NPs de PCL.

Nos résultats nous ont conduit à la conclusion que seuls deux paramètres permettent d'optimiser l'EE%, à savoir le ratio volumique de la phase aqueuse rapporté à la phase organique, ainsi que la quantité d'actif à encapsuler.

Classiquement, la valeur du ratio volumique de phase aqueuse sur la phase organique est de 2 / 1. La diminution de ce ratio a permis d'augmenter significativement le taux d'encapsulation (x 2,1). Les NPs d'eugénol ont alors

présenté une taille moyenne de 170.5 nm avec un PDI de 0.098, avec un potentiel zêta de -4.3mV. A un ratio inférieur ($< 1 / 1$), les NPs formulées ne se sont pas avérées stables. De même, l'augmentation du ratio ($> 3 / 1$) a entraîné l'agrégation des NPs. Ces résultats ont déjà été reportés dans la littérature et peuvent s'expliquer par une diffusion plus rapide du solvant organique dans la phase aqueuse quand le ratio diminue, impliquant une précipitation rapide du poly-(ϵ -caprolactone) et donc une diminution du transfert d'actif vers la phase aqueuse (Lalani, 2013).

Une diminution de la quantité d'eugénol utilisée a entraîné une augmentation de la taille des NPs avec un EE% très faible. En revanche, une augmentation a permis de multiplier par 1,7 le EE% de cette molécule dans les NPs de PCL par rapport au protocole standard, sans aucun effet sur la taille des NPs. Cette caractéristique pourrait s'expliquer par une augmentation des interactions entre la molécule et le polymère, tous deux hydrophobes, conduisant à une meilleure encapsulation (Pustulka, 2013). Aucune variation de taille, de PDI et de charge électrique n'a été mesurée.

A noter qu'augmenter les quantités de tensioactif a favorisé également l'encapsulation de l'eugénol dans les NPs sans affecter leur taille, le PDI, et leur charge électrique en accord avec les observations de Lamprecht *et al.* (Lamprecht, 2001). Cependant, cette augmentation s'est révélée relativement modeste ($\times 1,3$). Néanmoins, la toxicité des agents tensio-actifs pourrait limiter l'intérêt d'une telle préparation dans le domaine biomédical (Xiong, 2011). Nous avons donc préféré maintenir ce facteur à sa concentration seuil de 0.5 mg.mL^{-1} .

Les variations de la quantité et la masse molaire de polymère n'ont pas impacté le EE%, la taille, le PDI et la charge des NPs. Pourtant, de nombreuses études ont montré que ces paramètres engendrent habituellement une augmentation de la taille des NPs et du EE% (Nii, 2005). En effet, ces deux paramètres influencent directement la viscosité de la phase organique, souvent corrélée avec une augmentation de la taille des NPs et de l'EE%. Cependant, des résultats similaires aux nôtres ont été décrits par Giannavola *et al.* encapsulant l'acyclovir dans des NPs de poly-(lactic acid) (Giannavola, 2003) et par Beck-Broichsitter *et al.* s'intéressant au développement de NPs de PLGA encapsulant le salbutamol (Beck-Broichsitter, 2010). Dans notre étude, travaillant dans des conditions très diluées (1 mg.mL^{-1} de polymère dans la phase organique), la viscosité a très peu varié.

- Peut – on obtenir des nanoparticules encapsulant simultanément plusieurs molécules avec des taux d'encapsulation similaires et élevés ?

Nos résultats ont indiqué que pour les molécules encapsulées individuellement, l'EE% était corrélé avec le log P de la molécule. Cette observation n'a pas été retrouvée lors de l'encapsulation d'un mélange, qui affecte donc directement les propriétés intrinsèques des NPs. Nos résultats ont montré que les molécules fortement hydrophobes présentaient un EE% diminué lorsqu'elles sont encapsulées sous la forme de mélange (pour le géraniol seul, un EE% de 98% a été enregistré, alors que celui n'a été que 50% lorsque du FMI est encapsulé dans des NPs de PCL) tandis que les molécules de log P faible présentaient un meilleur EE% (pour l'hydroxycitronellal, des EE% de 5% et 42% ont été respectivement déterminés lorsqu'il a été encapsulé sous forme seule ou en mélange). Peu de données ont été reportées à ce jour dans la littérature sur l'encapsulation de mélange. En effet, les articles portant sur l'encapsulation de parfums ou d'huiles essentielles (mélanges complexes) étudient principalement le comportement de la ou des molécules majoritaires. Par exemple, Li *et al.* se sont intéressés à l'encapsulation d'une huile essentielle d'orange, mais une seule molécule a été dosée afin de déterminer le taux d'encapsulation ; aucune information sur la composition de l'ensemble des molécules n'a été rapportée (Li, 2013).

Afin d'optimiser le EE% pour le mélange, nous nous sommes ensuite basés sur les résultats obtenus pour l'encapsulation de l'eugénol. Les paramètres influant ont été criblés à savoir, la quantité de molécules à encapsuler et le ratio volumique de la phase aqueuse sur la phase organique. Des résultats comparables à ceux obtenus avec l'eugénol, ont été obtenus avec le mélange. Ainsi, un ratio volumique égal à 1 / 1 s'est avéré être le plus adapté pour optimiser l'encapsulation. Un EE% global de 81% a été obtenu pour une taille moyenne de 186 nm et un PDI de 0,1. D'autre part, comme pour l'eugénol, quel que soit le protocole appliqué, la taille moyenne des particules n'a pas été significativement affectée.

Ainsi, l'encapsulation d'un mélange de plusieurs molécules au sein de NPs polymères avec des taux d'encapsulation similaires pour toutes les molécules du mélange est possible. Le taux d'encapsulation est principalement influencé par la quantité de mélange à encapsuler. De plus, le comportement des molécules lors de l'encapsulation en mélange ou en forme isolée est totalement différent, le mélange semble adopter un coefficient de partage moyen et l'encapsulation est alors moyennée pour l'ensemble des molécules. Il serait intéressant de valider ces résultats avec d'autres polymères utilisés dans le domaine biomédical comme le PLGA, l'éthylcellulose... A noter toutefois que le taux d'encapsulation des molécules les plus hydrophiles reste faible. Une alternative intéressante consisterait à encapsuler chacune des molécules au sein de NPs distinctes, et ensuite à optimiser leur

taux d'encapsulation, en faisant varier : (i) - soit le procédé utilisé, (ii) - soit les paramètres de formulation du procédé d'encapsulation. Il ne resterait finalement qu'à mélanger ensuite les différentes NPs générées. Dans notre cas, les huit NPs pourraient être développées selon un procédé différent en fonction des propriétés physico-chimiques des molécules. Les systèmes colloïdaux formulés pourraient être concentrés et mélangés pour obtenir une suspension de NPs encapsulant l'ensemble des molécules du FMI.

1.2. La standardisation du protocole d'émulsion-sonication permet de formuler des nanoparticules lipidiques solides avec différents composés matriciels encapsulant le fragrance mix I (Articles 2/3)

Souhaitant générer des NPs de structures différentes de celles des NPs de PCL, nous avons dans un second temps porté notre intérêt sur des NPs lipidiques solides (SLNs). Ces dernières ont été formulées à base de lipides biocompatibles : (i) vaseline, (ii) palmitate de cétyle, (iii) triglycérides C10 – C18 et (iv) beurre de karité.

Ainsi, plusieurs protocoles peuvent être mis en œuvre pour produire des SLNs, tels que l'homogénéisation à chaud (Güney, 2014), l'homogénéisation à froid (Jahnke, 1998), l'homogénéisation haute pression... (Barman, 2014). Néanmoins, l'ensemble de ces procédés est basé sur trois étapes : (i) - une pré-émulsion est réalisée pour disperser le matériau matriciel dans une phase homogène, les gouttes alors formées possèdent une taille de quelques micromètres, (ii) - l'émulsion est ensuite soumise à une seconde étape d'homogénéisation très puissante (énergie en appliquée sous forme de pression, d'ultrasons...), permettant de réduire la taille de ces structures à l'échelle nanométrique, et (iii) - la nano-émulsion est enfin refroidie pour obtenir une suspension colloïdale. Deux procédés sont actuellement très employés : l'homogénéisation haute pression (HPH), et l'émulsion-sonication (ES) qui permettent d'obtenir des particules de taille variant entre 100 et 400 nm (Keck, 2006 ; Müller, 2000).

Pour générer des SLNs répondant à notre cahier des charges (voir ci-dessus), nous avons tout d'abord optimisé et comparé ces deux protocoles standards d'HPH et d'ES. Ces phases d'optimisation ont été entreprises à l'aide de SLNs de vaseline encapsulant de l'eugénol. Le choix des SLNs de vaseline a été dicté par le fait que ce matériau est très utilisé en dermatologie, notamment comme véhicule dans les protocoles de diagnostic de l'allergie de contact (Raison-Peyron, 2009). Le protocole optimal a ensuite été utilisé comme modèle pour produire les autres SNLs, encapsulant cette fois-ci du FMI.

1.2.1. Le procédé d'émulsion-sonication est régi par l'étape de sonication conditionnant la taille finale des SLNs (Article 3)

- *Quels sont les paramètres de formulation impactant les paramètres intrinsèques des SLNs générées par émulsion – sonication ?*

Des SLNs de vaseline ont été formulées à partir d'un procédé d'émulsion-sonication. Ce procédé permet d'obtenir des SLNs sous forme de suspensions colloïdales stabilisées par des tensioactifs.

Tout d'abord, nous avons criblé plusieurs couples de tensioactifs non ioniques présentant moins de risque de toxicité que les tensioactifs ioniques et permettant de stabiliser l'émulsion à chaud de vaseline dispersée dans de l'eau. Nous avons ainsi isolé un couple d'esters de sorbitan (polysorbate 40 et palmitate de sorbitan) permettant de formuler des SLNs de taille inférieure à 200 nm avec une stabilité de 7 jours. Ces conditions ont également été décrites par Gullapalli *et al.* formulant une émulsion à partir d'huile minérale (Gullapalli, 2002).

Un autre paramètre important dans la formulation de SLNs, est la quantité de composé matriciel introduite. Pour la déterminer, nous avons fait varier la concentration de vaseline de 4 % à 20 % dans la formule et étudié l'influence sur la taille des particules obtenues. Ainsi, nous avons montré que la concentration en vaseline n'avait aucune influence sur la taille moyenne des SLNs. Nous avons alors sélectionné la concentration de 4 % pour formuler des suspensions colloïdales peu concentrées facilitant la filtration stérilisante (les suspensions concentrées ayant tendance à colmater les filtres).

Au cours de l'étape d'émulsion, il est important d'obtenir une dispersion de taille monomodale de quelques micromètres. En effet, cette caractéristique est essentielle pour générer en fin de procédé des SLNs avec une distribution de taille étroite (Mehnert, 2001). La taille de la dispersion est alors régie par la vitesse et le temps de cisaillement. Ainsi, le diamètre moyen des gouttes diminue avec le temps d'agitation jusqu'à atteindre un plateau caractérisé par un temps limite qui sera fonction de la vitesse d'agitation, phénomène également observé par Leong *et al* (Leong, 2009). Nos résultats montrent que ce plateau est atteint après 300 s à 24 000 rpm, 2700 s à 20 000 rpm, et 3600 s à 19 000 rpm. Nous avons alors sélectionné la vitesse de 24 000 rpm pendant 300 s afin de limiter le temps total du procédé pour générer ces SLNs.

La pré-émulsion de taille mono-disperse a ensuite été placée sous ultrasons pour générer une nano-émulsion. Cette étape est classiquement influencée par deux paramètres, que sont : (i) - le temps d'application et (ii) - la puissance de sonication.

Dans le but d'étudier l'influence de la puissance de sonication sur la taille des SLNs générées, nous avons maintenu les autres paramètres constants, tout en faisant varier la puissance de 100 à 400 W, ceci avec un pas de 100 W. Au-delà de cette valeur seuil (400 W), une déstabilisation du système a été observée en raison d'une forte augmentation de température qui a entraîné la formation d'agglomérats. Nous avons observé une diminution de la taille moyenne des SLNs, essentiellement entre 100 et 200 W, alors que leur taille est restée constante pour des puissances supérieures à 200 W. Nous avons ainsi fixé la puissance de sonication à 200 W. Abbas *et al.* formulant des SLNs d'acide octénysuccinique et d'amidon anhydre ont utilisé des puissances voisines, entre 120 et 360 W pour générer des NPs avec une taille moyenne de 200 nm (Abbas, 2014).

Capitalisant sur ces résultats, l'influence du temps a alors été étudiée. Un temps de 60s s'est révélé comme le plus adapté, permettant d'obtenir des SLNs de taille < 200 nm, et de forme sphérique (en accord avec les résultats reportés par Singh et al. 2014 ou Dudhipala et al. 2014 (Singh, 2014 ; Dudhipala, 2014).

1.2.2. Le procédé d'homogénéisation haute pression est influencé par trois paramètres à savoir la concentration en lipides, le nombre de cycles d'homogénéisation et la pression (Article 2)

- Quels sont les paramètres de formulation impactant les propriétés intrinsèques des SLNs générées par homogénéisation haute pression?

Des SLNs de vaseline ont été formulées à partir d'un procédé d'HPH.

Le protocole d'HPH a été mis au point à partir des données recueillies au cours de l'expérience précédente, le développement de la pré-émulsion du point de vue du tensioactif, a été basé sur l'utilisation du couple de tensioactifs polysorbate 40 et palmitate de sorbitan, avec une vitesse de 24 000 rpm et un temps de cisaillement de 300 s.

Cette dispersion a alors été introduite dans la tête d'homogénéisation, afin de générer des gouttelettes sous l'effet des forces de cavitation, de cisaillement et de collision. Un cycle d'homogénéisation correspond au temps nécessaire pour que l'ensemble de l'échantillon ait circulé dans cette zone. En général, plusieurs cycles d'homogénéisation sont nécessaires pour atteindre des SLNs de faibles tailles. En outre, leur taille sera aussi corrélée à la pression appliquée dans l'appareil, ainsi qu'à la quantité d'échantillon introduite et à la concentration de vaseline utilisée (Möschwitzer, 2013).

Ainsi, nous avons réalisé un plan d'expérience pour déterminer l'influence : (i) - de la concentration en vaseline, (ii) - du nombre de cycles d'homogénéisation et (iii) - de la pression, sur la taille moyenne des SLNs et sur leur PDI. Comme attendu, ces trois

paramètres ont bien dictés les propriétés des SLNs obtenues (Muchow, 2008). Ainsi, plus la pression appliquée a été grande, plus la taille des SLNs s'est avérée petite. Ce phénomène a également été rapporté par Severino *et al.* au cours d'une étude portant sur le développement de SLNs de Crodamol® (Severino, 2012), et par Liu *et al.* formulant des SLNs de distéarate de glycérol (Liu, 2007). D'autre part, plus le nombre de cycles d'homogénéisation a été important, plus la taille des SLNs a diminué, jusqu'à atteindre un palier à partir de 10 cycles. Enfin, une concentration en vaseline de 5 % a permis d'obtenir des SLNs de taille recherchée. En effet, nous avons observé qu'au-delà de cette concentration ($>$ ou $<$ 5%), la taille des SLNs était significativement plus grande. Martins *et al.* formulant des SLNs de trimyristine, ont montré que l'augmentation de la concentration en lipides de 5 à 15 % et donc de la viscosité de l'émulsion, s'accompagnait également d'une augmentation de la taille moyenne des particules (Parhi, 2012).

Finalement, notre protocole retenu (900 bars de pression, 10 cycles d'homogénéisation, une concentration de vaseline 5 %) s'est avéré légèrement différent de celui décrit par Muchow M *et al.* (500 bars de pression, 5 cycles d'homogénéisation) pour produire de façon standardisée des SLNs de taille $<$ 200 nm, et de faible PDI (Muchow, 2008).

Nous avons ainsi généré des SLNs de vaseline d'une taille moyenne de 134,1 nm et un PDI de 0,184, conformément aux critères exigés.

1.2.3. Le procédé d'émulsion-sonication est plus adapté que le procédé d'homogénéisation haute pression pour l'encapsulation de l'eugénol au sein de SLNs à base de vaseline (Article 3)

- Quel est le procédé le plus adapté pour formuler des SLNs ?

Une fois les protocoles d'ES et de d'HPH optimisés, nous avons alors déterminé quel procédé était le plus adapté pour formuler des SLNs de vaseline encapsulant l'eugénol. Ces deux procédés ont conduit respectivement à la formulation de SLNs de tailles moyennes de 128,5 nm avec un PDI de 0,186 pour l'HPH, et de 194,6 nm avec un PDI de 0,162 pour l'ES. Ainsi, les SLNs obtenues avec l'HPH présentent une taille significativement plus faible par rapport aux SLNs obtenues par ES. Une distribution de taille plus étroite a en revanche été mesurée avec le procédé ES. Cette différence peut être attribuée aux forces de dispersion appliquées au système. Dans un procédé d'HPH, la pression appliquée à l'émulsion est caractérisée par une distribution d'énergie homogène du fait de la petite taille de l'espace d'homogénéisation (25 - 30 μ m). L'étape de sonication induit une distribution d'énergie non homogène dans le volume de dispersion, la force appliquée étant fonction de la localisation de la goutte dans le volume (Mehnert, 2001). Les différences de distribution d'énergie entre

ces deux procédés semblent donc affecter uniquement la taille des SLNs mais pas leur distribution. D'autre part, ces deux techniques n'ont pas affiché de différences du point de vue du rendement global. De même, le taux d'encapsulation s'est avéré légèrement mais significativement ($P < 0.0001$) plus grand avec le procédé d'ES (91.6%) comparé à l'HPH (88.5%).

1.2.4. Le protocole d'émulsion–sonication standardisé peut être appliqué pour générer des SLNs avec différents lipides matriciels (Article 3)

Souhaitant obtenir des SLNs de taille inférieure à 200 nm avec un taux d'encapsulation maximal, nous avons alors sélectionné le procédé d'émulsion – sonication comme standard pour formuler de nouvelles SLNs à base divers lipides tels que le palmitate de acétyle, les triglycérides C10-18, la cire de candelilla, la cire d'abeille, ou le beurre de karité.

- Peut – on obtenir des SLNs de différentes natures avec le procédé d'émulsion – sonication optimisé ?

Nous avons capitalisé sur le développement de SLNs biocompatibles générées avec des lipides de natures chimiques différentes. Les cires d'abeille et de candelilla présentent une composition lipidique similaire regroupant un mélange d'hydrocarbures, d'esters d'acides gras et d'alcools gras libres. Le palmitate de cétyle est composé d'acides gras saturés et d'alcools libres. Le beurre de karité est essentiellement composé d'acides gras. Les triglycérides C10-18 correspondent à un mélange de petites chaînes de triglycérides. A noter que ces différents lipides présentent des points de fusion compris entre 35 et 70°C et un comportement rhéologique non –newtonien.

A l'instar de nos travaux sur la vaseline, un criblage de couples de tensioactifs hydrophiles et hydrophobes a été réalisé afin de stabiliser les suspensions colloïdales formulées. Leur concentration a été ajustée de manière à répondre à l'équilibre hydrophile / lipophile requis (HLB_R) de ces différents lipides. Les conditions de l'étape d'émulsion ont été fixées à 24 000 rpm pendant 300 s permettant de formuler des émulsions mono-disperses avec des gouttelettes de quelques micromètres quel que soit le lipide utilisé. L'étape de sonication a été optimisée pour l'ensemble des lipides testés. Ces protocoles ont ensuite été appliqués à l'encapsulation du FMI.

Nous avons obtenu pour chaque type de lipides des SLNs de taille moyenne inférieure à 200 nm, avec une distribution étroite, excepté pour la cire d'abeille. Ne répondant pas aux critères fixés, ce composé matriciel n'a donc pas été sélectionné.

- Comment la nature des lipides influence la taille des SLNs ?

L'ensemble de nos résultats nous ont permis d'établir qu'il existait une corrélation entre la taille moyenne des SLNs et la viscosité des composés matriciels ; ainsi la taille s'est révélée être inversement proportionnelle à la viscosité ($S_{\text{pearman}} = -0,9429$ et valeur de $P < 0,01$ (**)). Cette observation s'oppose à la théorie de Jahnke reportant une augmentation de la taille moyenne des SLNs de façon proportionnelle à la viscosité de la phase dispersée (étude réalisée sur une zone de 50 à 300 mPa.s) (Jahnke, 1998). Contrairement aux résultats de Jahnke, nous avons utilisé ici des lipides dont la viscosité se situait entre 8,4 et 83.4 mPa.s, contre 50 et 300 mPa.s pour Jahnke (Jahnke, 1998).

Ahlin *et al.* ont montré que la composition de la phase lipidique peut avoir également un effet considérable sur la taille moyenne des particules ; la présence de chaînes carbonées plus courtes ou de groupements réactifs permettent de minimiser les forces de répulsion au sein de la structure et de former des NPs de faibles tailles (Ahlin, 1998). Ceci pourrait expliquer pourquoi il ne nous a pas été possible de générer des SLNs à base de cire d'abeille de taille < 200 nm. En effet, cette cire contient des chaînes carbonées beaucoup plus longues (C48) que celles des autres matrices lipidiques employées.

En parallèle de nos travaux sur les NPs de PCL, nous avons ensuite cherché à établir dans quelle mesure la nature des composés matriciels impactent le taux d'encapsulation du FMI et de ces différents constituants.

- Peut – on obtenir des SLNs encapsulant simultanément plusieurs molécules avec des taux d'encapsulation similaires et élevés avec des lipides de nature différente ?

Le EE% global de FMI a été calculé comme la moyenne des EE% pour chacun de ces constituants. Nous avons ainsi obtenu des taux d'encapsulation du FMI allant de $66,5 \pm 0,5\%$ (minimum) pour les SLNs de vaseline à $94,9 \pm 0,5\%$ (maximum) pour les SLNs de palmitate de cétyle. Cependant, pour expliquer ces différences, nous n'avons observé aucune corrélation entre la viscosité des composés matriciels ou leur point de fusion ($r_{\text{spearman}} = -0,1$ (valeur $P = 0,48$) et $r_{\text{spearman}} = 0,56$ (valeur de $P = 0,35$)). Les propriétés physico-chimiques des matrices lipidiques ne semblent donc pas influencer le taux d'encapsulation du mélange de parfums. Souto *et al.* ont montré que le taux d'encapsulation était fortement lié à la cristallinité des lipides ; néanmoins, nous n'avons pu recueillir ces informations au cours de notre étude (Souto, 2006).

L'analyse du comportement de l'ensemble des constituants du FMI a mis en avant des différences d'encapsulation en fonction de la molécule et de la matrice lipidique. Pour presque tous les types de SLNs étudiés (exception faite du palmitate de cétyle), une

corrélation entre le log P de la molécule et le taux d'encapsulation a pu être observée (pour les SLNs à base de C10-18 triglycérides : $r_{\text{spearman}} = 0,857$ et valeur de $P = 0,012$, pour les SLNs à base de de beurre de karité : $r_{\text{spearman}} = 0,893$ et valeur de $P = 0,006$, pour les SLNs de vaseline : $r_{\text{spearman}} = 0,893$ et valeur de $P = 0,006$; pour les SLNs de candelilla : $r_{\text{spearman}} = 0,9286$ et valeur de $P = 0,003$). Plus le log P était petit, plus l'encapsulation s'est révélée faible à la différence des NPs de PCL (voir ci-dessus). L'ensemble des constituants du FMI ont en revanche été encapsulée à des taux maximum dans les SLNs à base de palmitate de cétyle.

- *Quelle est la stabilité physico-chimiques des SLNs générées?*

Enfin, nous avons examiné la stabilité physico-chimique des SLNs générées. Ces dernières ont présenté une stabilité d'un mois sans libération de parfums, exceptées pour les SLNs à base de beurre de karité. Cette instabilité est souvent expliquée par la présence de nombreuses structures dans la préparation (comme des nanoparticules liquides cristallisées, des nano-émulsions...) dont le comportement va évoluer dans le temps (Wissing, 2004). L'instabilité des SLNs est également souvent due au phénomène de gélification correspondant à la transformation rapide d'une dispersion de faible viscosité en un gel visqueux. La gélification est expliquée par la cristallisation simultanée de plusieurs formes polymorphes des lipides, stables et instables (Freitas, 1999). Pour augmenter le temps de stockage, une étape de lyophilisation pourrait être utilisée permettant de diminuer les réactions d'hydrolyse ou un traitement thermique pour stabiliser les formes cristallines. Plusieurs procédés ont été décrits par Mehnert *et al.* mais cette étape reste néanmoins difficile à réaliser avec des SLNs aboutissant le plus souvent à une mauvaise re-suspension et une augmentation de la taille des particules (Mehnert, 2001).

En résumé, ce travail nous a donc permis de mettre au point deux protocoles permettant de générer des nanoparticules encapsulant un mélange de parfums répondant aux exigences fixées (taille moyenne inférieure à 200 nm et un PDI inférieur à 0,2). Il s'agit de deux types de structures, des NPs polymères et des SLNs présentant des propriétés physico-chimiques et de surfaces différentes. Ces vecteurs ont été appliqués pour le développement de promoteurs de la pénétration cutanée et pour le développement d'un test diagnostique de l'EAC. Cependant, plusieurs points pourront conduire à des études complémentaires, notamment des investigations portant sur la stabilité des SLNs. En effet, il serait intéressant de faire varier la force ionique, la concentration en sel ou le pH pour éviter les phénomènes de déstabilisation... De plus, la cristallinité des lipides influence le taux d'encapsulation, le profil de libération, et la stabilité. Celle-ci va varier en fonction du gradient

de refroidissement plus ou moins rapide... et pourra être évaluée par diffraction des rayons X et par calorimétrie différentielle à balayage.

2. Les nanoparticules se présentent comme de véritables promoteurs d'absorption cutanée et ciblent différents compartiments en fonction de leur propriété de surface (Article 4)

Les NPs polymères et lipidiques générées ont ensuite été évaluées pour la vectorisation d'un mélange de molécules à travers la peau. Notre modèle d'étude a été basé sur l'utilisation de cellules de Franz et d'explants de peau de porc. La pénétration des molécules et / ou des particules dans les différentes assises cutanées a été mesurée par chromatographies et visualisée par les techniques de microscopie à balayage et de microscopie multi-photonique.

Dans ce travail, nous avons étudié comment le FMI et ses constituants, encapsulés dans des NPs polymères ou lipidiques étaient distribués à travers les différentes assises cutanées suite à l'application de suspensions aqueuses contenant les NPs, pendant 24h, à la surface des explants. Nous avons également étudié si cette distribution était impactée par la charge électrique de la particule. Enfin, nous avons tenté de visualiser si les NPs étaient dégradées ou non dans la peau.

Etudier la pénétration cutanée de ces parfums dans la peau avait pour but de modéliser le comportement des molécules d'un mélange administré par application topique. En effet, il n'existait pas de réel intérêt à améliorer la pénétration de parfums dans cette structure, sauf pour éventuellement optimiser la sensibilité du diagnostic de l'allergie aux parfums par les patch-tests. De plus, dans certains cas, les molécules odorantes qui appartiennent à la famille des terpènes ont été mis en œuvre en tant que promoteur de l'absorption cutanée, c'est notamment le cas de l'eugénol et du géraniol (Varman, 2012 ; Magnusson, 1997 ; Nair, 2004 ; Yerramsetty, 2010). En effet, ces terpènes sont capables de perturber la structure lipidique du *stratum corneum* modifiant l'intégrité de cette fonction barrière (Sapra, 2008) et promouvoir la pénétration d'autres molécules.

2.1. La nature des NPs dicte la pénétration cutanée (Article 4)

- Comment la nature des NPs organiques influence-t-elle la pénétration cutanée de l'eugénol ?

Au cours de ce travail, nous avons tout d'abord cherché si les différents nano-vecteurs générés permettaient de contrôler le ciblage et la libération de l'eugénol (molécule modèle) dans les différentes assises cutanées.

A cette fin, huit formulations ont été testées, regroupant des NPs polymères (PCL et PLGA), des SLNs (à base de vaseline, de palmitate de cétyle, de triglycérides C10-18 et de beurre de karité) et des liposomes (de phosphatidylcholine) possédant une taille voisine, proche de 200 nm avec une distribution de taille étroite. Toutes ces NPs présentaient des propriétés de surface (groupements chimiques) et une charge électrique différentes, neutre (NPs polymères) ou négative (SLNs et liposomes) et des EE% compris entre 41,6 % (NPs polymères) et 98,1 % (SLNs). La pénétration de ces nano-vecteurs a été comparée à celle d'une solution contrôle contenant 5 % de tensioactifs non ioniques. La même concentration d'eugénol a été appliquée sur la peau avec toutes ces formes.

Les résultats ont mis en avant le rôle des NPs en tant que promoteur d'absorption cutanée excepté pour les SLNs à base de triglycérides et de beurre de karité, induisant une pénétration de l'eugénol similaire à celle obtenue avec la solution contrôle. En outre, toutes les NPs n'ont pas présenté le même profil ; cette différence pouvant être attribuée à leurs diverses natures. En effet, une accumulation d'eugénol dans le *stratum corneum* (SC) a été observée avec les SLNs et les liposomes. Contrairement, aux NPs polymères et plus particulièrement aux NPs de PCL qui ont permis la pénétration de 34,9 %, de la quantité d'eugénol appliquée en surface, au sein des couches internes : 0,7% dans l'épiderme, 7,5% dans le derme et jusqu'à 26,7% dans le liquide récepteur. Ces résultats sont en accord avec la littérature.

Les SLNs sont généralement utilisées pour prolonger la libération des molécules encapsulées dans le SC. Ainsi, Clares *et al.* présentent les SLNs comme des vecteurs qui se déstabiliseraient à la surface de la peau et formeraient un film occlusif après avoir libéré l'actif encapsulé, ce qui permettrait également de limiter la perte insensible en eau (Clares, 2014). Néanmoins, cette hypothèse n'a pas été confirmée par Santos Maia *et al.* Au cours de leurs travaux portant sur le rôle des SLNs dans la pénétration cutanée, ces auteurs ont comparé la pénétration du prednicarbate ($\log P = 4.2$) encapsulé au sein de SLNs dispersées dans une crème, et des SLNs vides dispersées dans une crème contenant des SLNs vides. Leurs résultats montrent que le prednicarbate est retrouvé dans l'épiderme uniquement lorsqu'il est encapsulé au sein de la particule. Ainsi, les auteurs ont mis en évidence que les SLNs ne jouent pas seulement un rôle d'agent filmogène, mais qu'elles pénétreraient bien dans la structure pour libérer leur contenu, ou favoriseraient, de par leur action en surface, la pénétration de l'actif (Santos Maia, 2002). De plus, Keith *et al.* ont suggéré que les phospholipides, constituants majeurs des liposomes, pourraient pénétrer dans le SC et interagiraient avec les lipides cutanés facilitant ainsi le passage des molécules (Keith, 1982).

Dans le cas des NPs polymères, une augmentation jusqu'aux couches les plus profondes est alors possible. Alvarez-Roman *et al.* en s'intéressant à la pénétration cutanée des NPs de polystyrène encapsulant un marqueur fluorescent, le fluorescéine-isothiocyanate 5 (FITC), ont mis en évidence par microscopie confocale à balayage laser, une accumulation des NPs dans les sillons cutanés et dans les follicules pileux (Alvarez-Román, 2004). Shim *et al.* ont observé une accumulation du monoxidil ($\log P = -0,458$) dans la peau et dans le liquide récepteur après application dans des NPs de copolymères de PCL et de polyéthylène glycol (Shim, 2004).

Au cours de leur étude Kùchler *et al.* ont également comparé la pénétration de SLNs de béhénate de glycérol (150 - 170 nm) et de NPs polymères (30 – 40 nm) encapsulant un marqueur fluorescent, le Nile-Red ($\log P = 5$) par microscopie de fluorescence. Ils ont ainsi montré que les NPs polymères pénètrent plus profondément dans la peau en comparaison des SLNs (Kùchler, 2009). Bouwstra *et al.* ont rapporté que les NPs à base de lipides ont tendance à fusionner avec le *stratum corneum*, car cette couche lipophile est constituée de cornéocytes riches en kératine et en lipides présentant des caractéristiques voisines aux SLNs (grande hydrophobie). Les particules polymères étant un peu moins hydrophobes, celles-ci pourraient pénétrer plus profondément dans la peau (Bouwstra, 2002).

Par conséquent, notre étude est en accord avec les résultats de la littérature, les NPs lipidiques s'accumuleraient dans le SC tandis que les NPs polymères pourraient rejoindre les couches les plus profondes, en particulier *via* les follicules pileux. Dans les stratégies de traitement par voie topique, l'utilisation de NPs lipidiques ou polymères sera donc choisie en fonction de la cible thérapeutique.

2.2. Les nanoparticules anioniques pénètrent plus en profondeur comparées aux NPs neutres et cationiques (Article 4)

- *Les propriétés de surface des nanoparticules polymères permettent-elles de contrôler le ciblage et la libération de plusieurs molécules dans la peau ?*

Afin de visualiser un effet de la charge électrique des particules sur le profil de pénétration cutanée de l'eugénol, nous avons ainsi choisi de travailler avec les NPs de PCL (vecteurs présentant la pénétration de l'eugénol optimale dans notre expérience précédente). Nous avons ainsi formulé trois types de NPs de PCL cationiques, anioniques, et neutres, avec une taille variant entre 110 et 290 nm.

Nos résultats ont montré que, dans le SC, la pénétration de l'eugénol était similaire pour les particules cationiques (12,4 % ($\pm 3,5$)) et anioniques (15,1 % ($\pm 3,6$)), mais était fortement diminuée lors de l'utilisation de particules neutres (2,4 % ($\pm 0,7$)). Dans les

couches plus profondes, la pénétration a été favorisée par les particules anioniques (46,2 % ($\pm 4,9$)), neutres (34,9 % ($\pm 6,6$)) puis cationiques (23,2 % ($\pm 2,8$)).

Dans la littérature plusieurs auteurs se sont intéressés à l'influence de cette propriété.

Song *et al.* étudiant la pénétration de l'héparine encapsulée dans des liposomes anioniques, cationiques et neutres ont montré qu'une meilleure pénétration était obtenue avec des liposomes cationiques (Song, 2006). Teixeira *et al.* ont expliqué ce phénomène par la présence d'interaction entre les particules cationiques et les structures anioniques de la peau comme les sulfates de cholestérol favorisant la pénétration cutanée (Teixeira, 2010). Lee *et al.* se sont intéressés aux différents profils de pénétration de NPs d'or de taille inférieure à 10 nm chargées positivement et négativement dans la peau de souris, par microscopie à transmission électronique. Ils ont mis en évidence une pénétration plus rapide et plus en profondeur des particules anioniques comparées aux particules cationiques (Lee, 2013). Duangjit *et al.* formulant des liposomes cationiques, neutres et anioniques avec un mélange de cholestérol et phosphatidilcholine encapsulant du méloxicam, ont mesuré la pénétration *in vitro* par cellule de diffusion. Les particules chargées (positivement ou négativement) ont présenté le même profil de pénétration *in vitro* que les particules neutres (Duangjit, 2014).

Abdel-Mottaleb *et al.* ont étudié l'influence de la charge électrique des particules d'éthyle cellulose (100 nm) encapsulant le Nile-Red (marqueur fluorescent) dans la peau de souris lésée et non lésée par microscopie confocale à balayage. Aucune différence de pénétration n'a été observée entre les NPs chargées et neutres pour une peau saine, en revanche pour une peau lésée, une meilleure pénétration des nanoparticules anioniques est observée comparée aux nanoparticules neutres et cationiques (Abdel-Mottaleb, 2012). Gillet *et al.* ont montré que les liposomes chargés négativement améliorent considérablement la pénétration du bétaméthasone dans l'épiderme par rapport à des liposomes chargés positivement et à des liposomes neutres dans la peau d'oreille de porc, en étudiant à la fois la pénétration par cellule de diffusion et par microscopie confocale à balayage (Gillet, 2011).

Ainsi, toutes ses données ne permettent pas d'établir de règle portant sur la pénétration des particules en fonction de leur charge électrique. Néanmoins, ces articles reportent que des particules cationiques ou anioniques permettent aux PA de pénétrer plus en profondeur dans la peau en comparaison aux particules neutres. Notre expérience confirme aussi ces résultats. Au sein de la peau, les différents constituants protéiques et les membranes cellulaires peuvent présenter une charge de surface, interagissant avec les NPs

chargées. Cette interaction de nature électrostatique pourrait influencer la pénétration des particules.

2.3. L'encapsulation d'un mélange de molécules modifie le profil de pénétration de ces molécules à travers les différentes assises cutanées

- Au-delà du type de vecteurs, les propriétés physico-chimiques des molécules encapsulées jouent-elles un rôle dans leur distribution à travers les différentes assises cutanées ?

Les pénétrations simultanées de plusieurs molécules encapsulées au sein de NPs PCL ou dispersées dans la solution contrôle ont été évaluées afin d'étudier l'action de l'encapsulation sur le profil de la pénétration. Nos résultats montrent que toutes les molécules pénètrent plus profondément dans la peau lorsqu'elles sont encapsulées. Dans le SC, aucune différence significative de pénétration n'a été évaluée entre les molécules encapsulées (quel que soit leur log P). En revanche, dans les couches plus profondes, la pénétration est différente en fonction du log P de la molécule. Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que les NPs de PCL se dégraderaient au niveau de l'épiderme ou du derme et libéreraient les molécules encapsulées.

Idson *et al.* ont montré que la pénétration de la molécule est directement proportionnelle à son coefficient de partage (Idson, 1975), et Hawkins *et al.* ont indiqué qu'une meilleure pénétration était obtenue pour des molécules de log P proche de 2 (Hawkins, 1986). Notre étude confirme ce résultat, le cinnamaldéhyde (log P = 2,1), l'alcool cinnamique (log P = 1,7) et l'eugénol (log P = 2,2) présentant les quantités totales absorbées les plus importantes.

Les NPs sont donc d'excellents promoteurs d'absorption d'un mélange de molécules. Cependant, la pénétration des constituants du mélange dans les couches internes semble dictée par leurs propriétés physico-chimiques intrinsèques (ceci pourrait être dû à la dégradation des NPs dans les couches profondes de la peau). De plus, nous avons observé qu'une molécule en mélange pénètre plus faiblement qu'une molécule appliquée en topique de façon individuelle (valable pour l'eugénol ; ce résultat est à confirmer pour d'autres molécules). Il reste à déterminer si les autres molécules du mélange influence la pénétration de cette molécule, suite à une action directe sur la structure cutanée ou sur les propriétés physico-chimiques de la molécule d'intérêt.

2.4. Les nanoparticules peuvent être visualisées au sein de la peau par microscopie électronique à balayage et par microscopie confocale à balayage

Afin d'établir la zone de dégradation des NPs dans la peau, nous avons cherché à visualiser celles-ci à l'aide de différentes techniques de microscopie. Pour ces travaux, nous nous sommes concentrés sur la visualisation de NPs de PCL.

- Est-il possible de visualiser les nanoparticules au sein du tissu cutané ?

Les techniques de microscopie peuvent être regroupées en deux classes, celles basées sur la fluorescence et celles basées sur des phénomènes électroniques. Dans la majorité des études, un fluorochrome est encapsulé au sein des NPs et leur localisation est visualisée par microscopie confocale à balayage (Toll, 2004 ; Sumian, 1999 ; Mordon, 2003 ; de Jalón, 20001 ; Vogt, 2006 ; Shim, 2004 ; Miyazaki, 2003). Néanmoins, cette méthode ne permet pas de visualiser la dégradation des particules dans ce tissu. L'étude par microscopie électronique à balayage permet de visualiser la structure de la nanoparticule mais il est difficile de les retrouver au sein d'un tissu aussi complexe que la peau.

Dans notre étude, nous avons observé le SC en microscopie électronique à balayage par analyses de strappes. Néanmoins, cette méthode ne pouvant être adaptée à la visualisation de l'ensemble de la peau, nous avons également introduit un fluorochrome dans les NPs polymères et étudié la pénétration dans les couches les plus internes par microscopie confocale. Les images montrent la présence d'agrégats de fluorochrome pouvant correspondre à des agrégats de particules dans l'épiderme et dans le derme. Il nous a été impossible de conclure si ces agrégats correspondent à des NPs encore intactes ou alors à des précipités de fluorochromes. Ces derniers se sont répartis de manière ponctuelle dans le tissu, pouvant indiquer une interaction particulière entre les particules et certains composés cutanés. La microscopie corrélative qui consiste à combiner simultanément des mesures en microscopie électronique à balayage et en microscopie à épi-fluorescence, nous permet à présent de recueillir l'information sur le fluorochrome mais également sur la structure avoisinant le fluorochrome. Cette technique nous permettrait donc de recueillir des informations nécessaires pour visualiser la pénétration des NPs dans la peau et pourrait donc être une perspective de travail intéressante (Gibson, 2014). De plus, l'utilisation de groupements fluorochromes greffés directement aux groupements du polymère pourrait également permettre le suivi plus précis des particules dans la peau par microscopie biphotonique.

3. Les nanoparticules sont des outils innovants adaptés au développement d'un test de diagnostic immunobiologique de l'eczéma allergique de contact aux parfums (Article 5)

Dans une dernière partie de nos travaux, nous avons capitalisé sur l'utilisation des NPs développées afin de solubiliser des haptènes hydrophobes dans des milieux de culture usuels. Ceci avait pour but de développer un nouveau test de diagnostic immunobiologique de l'EAC aux parfums basé sur la réactivation de lymphocytes spécifiques d'allergènes circulants dans le sang des patients suspectés d'EAC. Ce test se caractérisait comme une alternative complémentaire à la technologie des patch-tests, qui est utilisée de façon routinière pour le diagnostic de cette maladie. Cette approche des patch-tests présentent de nombreux écueils : (i) - la difficulté d'interprétation des résultats ; (ii) - le risque de « sensibilisation » active des personnes exposées, (iii) - la lourdeur du protocole pour les patients, ... (Krasteva, 1999 ; Castelain, 2009 ; Goossens, 2002 ; Mitchell, 1975). Aujourd'hui, il est possible de suivre les lymphocytes spécifiques circulants dans le sang des patients allergiques à des molécules hydrophiles qui sont solubles dans les milieux de culture, telles que des métaux (nickel), des médicaments... Néanmoins, comme la plupart des haptènes responsables d'EAC sont des molécules hydrophobes, difficiles à solubiliser dans les milieux de culture usuels, cette approche *in vitro* n'a jamais été véritablement étayée.

- L'utilisation de nano-vecteurs améliore-t-il la solubilisation du FMI dans les milieux de culture usuels?

Un seul type de NPs a été retenu pour développer le test *in vitro* de diagnostic. Il s'agit des NPs de PCL. En effet, les SLNs ont présenté une trop forte cytotoxicité pour envisager leur utilisation dans des tests immunobiologiques. Nos résultats montrent que les NPs de PCL sont des vecteurs innovants permettant d'augmenter la solubilisation des molécules hydrophobes dans les milieux de culture conventionnels.

- L'application des nanoparticules encapsulant du FMI permet-elle de réactiver de manière robuste des lymphocytes T spécifiques circulants chez des patients allergiques aux parfums?

Pour développer le protocole de diagnostic *in vitro*, nous nous sommes appuyés sur un test de prolifération lymphocytaire LTT (*Lymphocyte Transformation Test*) (Nyfeler, 1997 ; Pichler, 2004). Celui-ci consiste à (ré)-mettre en contact avec l'antigène d'intérêt, des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) provenant de patients allergiques ou de patients non allergiques. Les PBMCs provenant de patients allergiques sont fortement

réactivées par l'antigène alors que ceux des patients non allergiques ne prolifèrent pas. En effet, une fréquence de cellules spécifiques d'antigène circulantes extrêmement faible est mesurée dans le sang de patients non allergiques contrairement aux individus allergiques.

Afin de déterminer la robustesse de notre test *in vitro* pour identifier les patients allergiques aux parfums, nous avons mis en place une étude clinique visant à recruter des patients sensibilisés / allergiques au FMI, c'est à dire présentant des résultats positifs aux patch-tests et des patients non - sensibilisés / non – allergiques (patch-tests négatifs). Ces derniers ont été recrutés dans 2 centres d'investigation clinique (le service d'Allergologie et d'Immunologie Clinique du Centre Hospitalier Lyon-Sud et la clinique universitaire Saint-Luc à Bruxelles). Les résultats obtenus par LTT ont également été confrontés à l'analyse de la polarisation des LTs ; ainsi nous avons étudié la sécrétion de cytokines de type Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2), Th2 (IL-4) et Th17 (IL-17A).

Les NPs de PCL se sont montrées être des outils robustes permettant ainsi de caractériser les lymphocytes T circulants spécifiques impliqués dans l'EAC aux parfums. Nous avons également montré que les NPs augmentent l'internalisation des parfums dans les différentes populations de leucocytes (monocytes, lymphocytes T, lymphocytes B) grâce à un dispositif de cytométrie en flux combiné à l'imagerie de type ImageStream. Gamucci *et al.* ont également reporté des résultats similaires en étudiant l'internalisation NPs de FITC-SiO₂ de 50 nm sur des PBMCs (Gamucci, 2014). Ce résultat peut expliquer pourquoi les lymphocytes T peuvent être facilement stimulés *in vitro*.

Dans cette étude, le test développé présente une spécificité de 100 % et une sensibilité de 50 %. En effet, la moitié des patients présentant un patch-test positif, a présenté une réponse négative dans ce test de diagnostic *in vitro* et aucune réactivité n'a été observée après (ré)-stimulation des PBMCs chez des patients non allergiques. Ces résultats ont également été confirmés par analyse des cytokines chez les patients positifs dans le LTT, qui ont montré un profil de sécrétion de type Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2). Summer *et al.* s'intéressant à l'allergie aux Ni, ont montré des résultats similaires, les patients non sensibilisés n'ont pas présenté de sécrétion de cytokines tandis que les patients sensibilisés au Ni montrent une sécrétion d'IFN- γ , IL-2, IL-4 et IL-17 (Summer, 2010). Coulter *et al.* ont mené des études similaires portant sur l'allergie à la para- phényldiamine. Ils ont ainsi mis en évidence une sécrétion d'IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFN- γ , TNF- α , MIP-1 α/β , MCP-1 chez des patients sensibilisés non retrouvée chez des patients tolérants (Coulter, 2010). Ainsi, en fonction des haptènes étudiés, le profil de cytokines sécrétées n'est pas le même, en effet dans le cas des parfums, nous avons retrouvé peu de sécrétion de type Th-2 et Th-17. Les différents chimiques pourraient activer des récepteurs du danger

différents, entraînant des différences de polarisation lymphocytaires. Ceux-ci peuvent reconnaître les haptènes par liaison directe ou indirecte. Une reconnaissance directe des récepteurs de danger a été démontrée pour certains métaux comme le nickel, qui provoque l'activation du récepteur TLR4 humain. Le 2,4,6- trinitrochlorobenzène (TNCB) active indirectement les récepteurs TLR2 et les TLR4 *via* la dégradation d'acide hyaluronique.

Plusieurs raisons peuvent expliquer la différence de réponse entre les résultats des patch-test et ceux obtenus avec le test immunobiologique développé :

- (i) une mauvaise interprétation de la lecture de PT; les résultats PT peuvent être des faux positifs. En effet, les produits chimiques appliqués sous occlusion pendant 48 heures peuvent parfois causer des dermatites de contact irritant. Ces réactions sont souvent difficiles à distinguer des EAC par analyse visuelle (Nosbaum, 2009). La sensibilité et la spécificité des tests épicutanés est actuellement de l'ordre de 70 % (Summer, 2010 ; Mathelier-Fusade, 2009).

- (ii) la quantité des molécules composant le FMI solubilisées dans le milieu de culture n'est pas suffisante pour activer les cellules T, le taux d'encapsulation variant en fonction des molécules étudiées. Les molécules les plus hydrophiles sont dispersées dans le milieu sous forme libre et non encapsulées et vont ainsi pénétrer plus difficilement dans les cellules. La quantité de NPs encapsulant le FMI ne peut être augmentée entraînant une trop forte toxicité pour les cellules. De plus au cours de ces travaux, nous avons constaté que les nanoparticules vides pour des concentrations ($>12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ en PCL) induisaient la prolifération cellulaire non spécifique, limitant la concentration de NPs utilisées. Afin d'augmenter la sensibilité du test, une stratégie intéressante pourraient être basée sur l'utilisation d'un mélange de NPs encapsulant individuellement chaque molécule du mélange étudié développé avec des protocoles adaptés pour obtenir des taux d'encapsulation plus élevés. Il sera ensuite intéressant de déterminer si ces nouveaux vecteurs NPs peuvent améliorer la sensibilité de ce test *in vitro*.

En conclusion, cette étude suggère que l'encapsulation d'un mélange d'allergènes hydrophobes dans des NPs est une alternative intéressante pour le développement de tests *in vitro* basés sur le diagnostic de l'eczéma allergique de contact. Ces tests peuvent se présenter comme un outil complémentaire aux patch-tests actuellement utilisés.

CONCLUSION

Ce travail de thèse s'est inscrit dans le cadre d'un projet de recherche visant à développer de nouvelles formes galéniques pour leur application en immuno-dermatologie. Nous avons choisi de développer des nanoparticules, afin d'appréhender de nouvelles stratégies pour la vectorisation d'actifs à travers la peau, et de développer des outils qui permettent de solubiliser des molécules hydrophobes dans les tests *in vitro*.

Ce projet nous a permis d'acquérir des connaissances importantes en ce qui concerne l'encapsulation simultanée de plusieurs molécules dans des nanoparticules de nature différente. Nous nous sommes intéressés à l'optimisation du procédé de nanoprécipitation afin de générer des nanoparticules polymères. Nous avons comparé deux procédés d'obtention des nanoparticules lipidiques, à savoir l'utilisation d'un homogénéisateur haute pression ou l'utilisation d'ultrasons. Ces deux procédés en trois étapes, impliquent une pré-émulsion et une seconde étape d'homogénéisation permettant d'apporter suffisamment d'énergie au système pour formuler une nano-émulsion et une étape de refroidissement pour générer des nanoparticules lipidiques solides.

Après avoir formulé ces différentes suspensions colloïdales, nous avons établi leurs profils de diffusion et de distribution cutanées grâce à l'utilisation de cellules de diffusion statique à partir de peau de porc non viable. Les nanoparticules polymères se sont alors présentées comme les formes les plus adaptées pour promouvoir la pénétration transépidermique. En revanche, les nanoparticules lipidiques ont ciblé préférentiellement le *stratum corneum*. S'accumulant dans cette assise, elles pourraient être utilisées pour des traitements à libération prolongée. Nous avons également étudié l'effet de la charge électrique sur la pénétration cutanée des nanoparticules polymères ; nous avons ainsi mis en avant une meilleure pénétration des particules anioniques. L'évaluation de la pénétration simultanée de plusieurs molécules a montré que la vectorisation dans le *stratum corneum* était identique quel que soit le coefficient de partage de la molécule ; en revanche, dans les couches les plus profondes, les molécules évoluent différemment en fonction de leur hydrophilie ou lipophilie. Cette caractéristique pourrait être due à une dégradation potentielle des NPs polymères dans les couches internes de la peau. De plus, l'encapsulation simultanée de plusieurs molécules a induit également une modification de la pénétration en comparaison à la molécule seule. Ainsi lors de l'application topique de produits complexes, il est donc recommandé de suivre le profil de pénétration de l'ensemble des molécules et non pas d'une seule. Il reste beaucoup de recherches à réaliser et de voies à explorer, portant sur la visualisation des nanoparticules dans le tissu cutané et le suivi de leur dégradation pour observer avec précision la libération de l'actif.

Un second objectif de mon travail de thèse était de développer un nouveau test de diagnostic immunobiologique de l'eczéma allergique de contact aux parfums. Le principal challenge, dans sa mise en place, était de trouver un outil permettant de solubiliser les molécules odorantes hydrophobes dans les milieux de culture hydrophile. Nous avons ainsi capitalisé sur les propriétés des nanoparticules présentant une large surface spécifique permettant de former des suspensions colloïdales en phase aqueuse et d'optimiser les mécanismes d'internalisation des molécules dans les différentes populations cellulaires. Les leucocytes de patients allergiques et non allergiques aux parfums ont été mis en contact de nanoparticules polymères encapsulant un mélange de parfums. Le protocole était basé sur un test de transformation lymphocytaire et sur l'analyse du profil de polarisation des LTs. La prolifération des LTs a été corrélée avec un profil de sécrétion de type Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2). De plus, nos résultats ont permis de montrer que les NPs étaient internalisées par les différentes populations de leucocytes (monocytes, lymphocytes T, lymphocytes B). Le test mis en place a présenté une sensibilité de 50 % et une spécificité de 100 %. Afin d'augmenter la sensibilité de notre test, il serait intéressant de tester de nouvelles nanoparticules présentant des taux d'encapsulation plus élevés.

REFERENCES

2011/696/UE. Recommandations de la commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux. Journal officiel de l'Union européenne. 20.10.2011. L 275/38 :1-3.

Abbas S, Bashari M, Akhtar W, Li WW, Zhang X. Process optimization of ultrasound-assisted curcumin nanoemulsions stabilized by OSA-modified starch. *Ultrason Sonochem*. 2014;21:1265-74.

Abdel-Mottaleb MM, Moulari B, Beduneau A, Pellequer Y, Lamprecht A. Surface-charge-dependent nanoparticles accumulation in inflamed skin. *J Pharm Sci*. 2012;101(11):4231-4239.

Abismaïl B, Canselier JP, Wilhelm AM, Delmas H, Gourdon C. Emulsification by ultrasound : drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*. 1999;6:75-83.

Afsset. Les nanomatériaux -effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement: Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail, 2006:1-35.

Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset). (2010). Evaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et l'environnement. 2010. Saisine n°2008/005. Maisons-Alfort. 1-52.

Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Etat des connaissances relatif aux nanoparticules de dioxyde de titane et d'oxyde de zinc dans les produits cosmétiques en termes de pénétration cutanée, de génotoxicité et de cancérogenèse. 2011. Saisine n°2008/BCT0001. Maisons-Alfort. 1-55.

Ahlin P, Kristl J, Smid-Kobar J. Optimization of procedure parameters and physical stability of solid lipid nanoparticles in dispersions, *Acta Pharm*. 1998;48:257–267.

Ai J, Biazar E, Jafarpour M, Montazeri M, Majdi A, Aminifard S, Zafari M, Akbari HR, Rad HG. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1117-1127.

Aitken RJ, Creely KS, Tran CL. Nanoparticles: An Occupational Hygiene Review, Institute of Occupational Medicine, Health and Safety Executive (HSE), UK, Research Report. 2004;274:1-113.

Albanesi C, Scarponi C, Sebastiani S, Cavani A, Federici M, Sozzani S, Girolomoni G. A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases. *J Leukoc Biol*. 2001;70:617-623.

Ali MF, Salah M, Rafea M, Saleh N. Liposomal methotrexate hydrogel for treatment of localized psoriasis: preparation, characterization and laser targeting. *Med Sci Monit*. 2008;14:166–174.

Almouazen E, Bourgeois S, Boussaïd A, Valot P, Malleval C, Fessi H, Nataf S, Briançon S. Development of a nanoparticle-based system for the delivery of retinoic acid into macrophages. *Int J Pharm*. 2012;430:207-215.

Alvarez-Román R, Barré G, Guy RH, Fessi H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur J Pharm Biopharm*. 2001;52:191-195.

Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release*. 2004;99:53-62.

Andersen KE, Johansen JD, Bruze M, Frosch PJ, Goossens A, Lepoittevin JP, Rastogi S, White I, Menné T. The time-dose-response relationship for elicitation of contact dermatitis in isoeugenol allergic individuals. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001;170:166-171.

Api AM. Only Peru Balsam extracts or distillates are used in perfumery. Contact Dermatitis. 2006;54:179.

Apintanapong M, Noomhorm, A. The use of spray-drying to microencapsulate 2-acetyl-1-pyrroline, a major flavour component of aromatic rice. Int J Food Sci Tech. 2003;38:95-102.

Aptula AO, Roberts DW, Pease CK. Haptens, prohaptens and prehaptens, or electrophiles and proelectrophiles. Contact Dermatitis. 2007;56:54-56.

Arias JL. Advanced methodologies to formulate nanotheragnostic agents for combined drug delivery and imaging. Expert Opin Drug Deliv. 2001;8:1589-1608.

Arshady R. Microspheres and microcapsules: a survey of manufacturing techniques. I: Suspension cross-linking. Polymer Eng Sci. 1989;26:1746-1758.

Arvisenet G, Le Bail P, Voilley A, Cayot N. Influence of physicochemical interactions between amylase and aroma compounds on the retention of aroma in food-like matrices. J Agr Food Chem. 2002;50:7088–7093.

Augustin MA, Sanguansri L, Margetts C, Young B. Microencapsulation of food ingredients. Food Australia. 2001;53:220–223.

Austyn JM. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. J Exp Med. 1996; 183:1287-1292.

Bakker MAE, Galema SA, Visser A. Microcapsules of Gelatin and Carboxy Methyl Cellulose. 1999; EP0 937496A2, Unilever NV, NL; Unilever PLC, GB.

Bangs WE, Reineccius GA. Influence of dryer infeed matrices on retention of volatile flavor compounds during spray-drying. J Food Sci. 1981;47:254–259.

Banker GS, Rhodes CT. Modern Pharmaceutics. 4th edition. Marcel Dekker, New York, 2002 , vol. 121, pp. 864.

Barman RK, Iwao Y, Funakoshi Y, Ranneh AH, Noguchi S, Wahed MI, Itai S. Development of highly stable nifedipine solid-lipid nanoparticles. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2014;62:399-406.

Baroli B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin : fiction or reality? J Pharm Sci. 2010;99:21–50.

Barry B. Reflections on transdermal drug delivery. Pharm Sci Technol Today. 1999;2:41-43.

Batheja P, Sheihet L, Kohn J, Singer AJ, Michniak-Kohn B. Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and *in vitro* and *in vivo* skin distribution studies. J Control Release. 2011;149:159-167.

Bauer B, Andersson SI, Stenfeldt AL, Simonsson C, Bergstroom J, Ericson MB, Jonsson CA, Broo KS. Modification and expulsion of keratins by human epidermal keratinocytes upon hapten exposure *in vitro*. Chem Res Toxicol. 2011;24:737-743.

Beck-Broichsitter M, Gauss J, Gessler T, Seeger W, Kissel T, Schmehl T. Pulmonary targeting with biodegradable salbutamol-loaded nanoparticles. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv. 2010;23:47-57.

Beeler A, Engler O, Gerber BO, Pichler WJ. Long-lasting reactivity and high frequency of drug-specific T cells after severe systemic drug hypersensitivity reactions. J Allergy Clin Immunol. 2006;117:455-462.

Behne M, Uchida Y, Seki T, de Montellano PO, Elias PM, Holleran WM. Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function J. Invest. Dermatol. 2000;114:185-192.

Belsito DV. The diagnostic evaluation, treatment, and prevention of allergic contact dermatitis in the new millennium. J Allergy Clin Immunol. 2000;105:409-420.

Benita S, Friedmann D, Weinstock M. Pharmacological evaluation of an injectable prolonged release emulsion of physostigmine in rabbits. J Pharm Pharmacol. 1986a;38:653-658.

Benita S, Friedmann D, Weinstock M. Physostigmine emulsions: a new injectable controlled release delivery system. Int J Pharm. 1986b;3:47-55.

Bennett CL, Noordegraaf M, Martina CA, Clausen BE. Langerhans cells are required for efficient presentation of topically applied hapten to T cells. J Immunol. 2007;179:6830-6835.

Benoit JP, Brault D, Lapidus O, Lognone V, Morteau S, Richard J. Textile or clothing article, toilettries or body care product, bearing microcapsules, and methods for making the same WO/2000/005446, 2000.

Benoit JP, Richard J, Venier-Julienne MC. Microencapsulation. Techniques de l'ingénieur. 2013;J2210:1-22.

Benson H. Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. Curr Drug Deliv. 2005;2:23-33.

Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK, Picker LJ, Butcher EC. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. J Exp Med. 1991;174:1461-1466.

Blume-Peytavi U, Massoudy L, Patzelt A, Lademann J, Dietz E, Rasulev U, Garcia Bartels N. Follicular and percutaneous penetration pathways of topically applied minoxidil foam. Eur J Pharm Biopharm. 2010;76:450-453.

Boas U, Heegaard PMH. Dendrimers in drug research. CHem Soc Rev. 2004;33:43-63

Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. Immunity. 1995;3:87-98.

Boncheva M, Damien F, Normand V. Molecular organization of the lipid matrix in intact *stratum corneum* using atr-ftir spectroscopy. Biochim Biophys Acta. 2008;1778:1344-1355.

Bouchard D, Ma X. Extraction and high-performance liquid chromatographic analysis of C60, C70, and [6,6]-phenyl C61-butyric acid methyl ester in synthetic and natural waters. J Chromatogr A, 2008; 1203:153-159.

Boudry I, Trescos Y, Vallet V, Cruz C, Lallement G. Méthodes et modèles d'étude de l'absorption percutanée des composés organophosphorés. Pathologie Biologie. 2008;56:292-299.

Bour H, Peyron E, Gaucherand M, Garrigue JL, Desvignes C, Kaiserlian D, Revillard JP, Nicolas JF. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. Eur J Immunol. 1995;25:3006-3010.

- Boutboul A, Giampaoli G, Feigenbaum A, Duvruet V. Use of inverse gas chromatography with humidity control of the carrier gas to characterize aroma-starch interactions. *Food Chem.* 2002;71:387-392.
- Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL. Skin structure and mode of action of vesicles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54:S41–S55.
- Boyce ST, Christianson D, Hansbrough JF: Structure of a collagen-GAGA skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes. *J Biomat Res* 1988;22:939–957.
- Brasch, J. New contact allergens. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007;7:409-412.
- Brites MM, Goncalo M, Figueiredo A. Contact allergy to fragrance mix 1 a 10-year study. *Contact Dermatitis.* 2000;43:181-182.
- Britschgi M, von Greyerz S, Burkhart C, Pichler WJ. Molecular aspects of drug recognition by specific T cells. *Curr Drug Targets.* 2003;4:1-11.
- Bronaugh RL, Stewart RF, Congdon ER. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies. Animal models for human skin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1982;62:481-488.
- Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI et Sarason R. *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in rhesus monkeys and humans. *Fd Chem Toxic.* 1990;28:369-373.
- Brown EN, Kessler MR, Sottos NR, White SR. In situ poly(urea-formaldehyde) microencapsulation of dicyclopentadiene. *J Microencapsul.* 2003;20:719-730.
- Bruze M, Andersen K E, Goossens A. Recommendation to include fragrance mix 2 and hydroxyisohexyl 3- cyclohexene carboxaldehyde (Lylal) in the European baseline patch test series. *Contact Dermatitis.* 2008;58:129-133.
- Buckley DA. Fragrance ingredient labelling in products on sale in the U.K. *Br J Dermatol.* 2007;157: 295-300.
- Buckley DA, Basketter DA, Kan-King-Yu D, White IR, White JL, Mcfadden JP. Atopy and contact allergy to fragrance: allergic reactions to the fragrance mix I (the Larsen mix). *Contact Dermatitis.* 2008 ;59:220-225.
- Cai W, Shin DW, Chen K, Gheysens O, Cao Q, Wang SX, Gambhir SS, Chen X. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Lett.* 2006;6:669-676.
- Canselier JP, Delmas JP, Delmas H, Wilhelm AM, Abismaïl L. Ultrasound emulsification – An overview. *J. Disp. Sci. Technol.* 2002;23:1-3.
- Castelain M. Effets secondaires, complications et contre-indications des patch-tests. *Ann Dermatol Venereol.* 2009;136:645-649.
- Castro GA, Oliveira CA, Mahecha GA, Ferreira LA. Comedolytic effect and reduced skin irritation of a new formulation of all-trans retinoic acid-loaded solid lipid nanoparticles for topical treatment of acne. *Arch Dermatol Res.* 2011;303:513-520.
- Cavani A, De Pità O, Girolomoni G. New aspects of the molecular basis of contact allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007;7:404-408.

- Cavani A, Nasorri F, Prezzi C, Sebastiani S, Albanesi C, Girolomoni G. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol.* 2000;114:295-302.
- Cevikbas F, Steinhoff A, Homey B, Steinhoff M. Neuroimmune interactions in allergic skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007;7:365-373.
- Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60:1627–1637.
- Chen AI, McAdam AJ, Buhlmann JE, Scott S, Lupher ML Jr, Greenfield EA, Baum PR, Fanslow WC, Calderhead DM, Freeman GJ, Sharpe AH. Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions. *Immunity.* 1999;11:689-698.
- Chen H, Chang X, Du D, Liu W, Liu J, Weng T, Yang Y, Xu H, Yang X. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *J Control Release.* 2006;110:296-306.
- Chen Y, Zhou L, Yuan L, Zhang ZH, Liu X, Wu Q. Formulation, characterization, and evaluation of *in vitro* skin permeation and *in vivo* pharmacodynamics of surface-charged tripterine-loaded nanostructured lipid carriers. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:3023-3032.
- Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol.* 2007;19:400-408.
- Cheon J, Lee JH. Synergistically Integrated Nanoparticles as Multimodal Probes for Nanobiotechnology. *Acc Chem Res.* 2008;41:1630–40.
- Chernenko T, Matthäus C, Milane L, Quintero L, Amiji M, Diem M. Label-free Raman spectral imaging of intracellular delivery and degradation of polymeric nanoparticle systems. *ACS Nano.* 2009;3:3552-3559.
- Chirico F, Fumelli C, Marconi A, Tinari A, Straface E, Malorni W, Pellicciari R, Pincelli C. Carboxyfullerenes localize within mitochondria and prevent the UVB-induced intrinsic apoptotic pathway. *Exp Dermatol.* 2007;16:429-436.
- Chow LC, Sun LM. Nanostructured bioactive materials prepared by dual nozzle spray drying techniques. 2006; US 20060110306.
- Clares B, Calpena AC, Parra A, Abrego G, Alvarado H, Fangueiro JF, Souto EB. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. *Int J Pharm.* 2014;473:591-598.
- Clift Martin JD, Rutishauser BR, Brown DM, *et al.* The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol-Appl Pharmacol.* 2008;232:418-427.
- Coenraads PJ, Goncalo M. Skin diseases with high public impact. Contact dermatitis *Eur J Dermatol.* 2007;17:564-565.
- Copple IM, Goldring CE, Jenkins RE, Chia AJ, Randle LE, Hayes JD *et al.* The hepato toxic metabolite of acetaminophen directly activates the Keap1-Nrf2 cell defense system. *Hepatology.* 2008;48:1292-1301.
- Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. The keap1-nrf2 cellular defense pathway: mechanisms of regulation and role in protection against drug-induced toxicity. *Handb Exp Pharmacol.* 2010;196:233-266.

Coulter EM, Jenkinson C, Farrell J, Lavergne SN, Pease C, White A, Aleksic M, Basketter D, Williams DP, King C, Pirmohamed M, Park BK, Naisbitt DJ. Measurement of CD4+ and CD8+ T-lymphocyte cytokine secretion and gene expression changes in p-phenylenediamine allergic patients and tolerant individuals. *J Invest Dermatol.* 2010;130:161-174.

Couvreur P, Kante B, Roland M, Guiot P, Bauduin P, Speiser P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J Pharm Pharmacol.* 1979;31:331-332.

Crocker GC, Pritchett DE. Improved encapsulated citrus oils. *Food Tech.* 1978;32:36-45.

Cumberbatch M, Kimber I. Tumour necrosis factor-alpha is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunology.* 1995;84:31-5.

Damien F, Boncheva M. The extent of orthorhombic lipid phases in the *stratum corneum* determines the barrier efficiency of human skin *in vivo*. *J Invest. Dermatol.* 2010;130:611-614.

de Fine Olivarius F, Hansen AB, Karlsmark T, Wulf HC. Water protective effect of barrier creams and moisturizing creams: a new *in vivo* test method. *Contact Dermatitis.* 1996;4:219-225.

de Groot AC, Bruynzeel DP, Bos JD, van der Meeren HL, van Joost T, Jagtman B A, Weyland J W. The allergens in cosmetics. *Arch Dermatol.* 1988;124:1525-1529.

de Jalón EG, Blanco-Prieto MJ, Ygartua P, Santoyo S. PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. *Int J Pharm.* 2001;226:181-184.

de Jongh GJ, Zeeuwen PL, Kucharekova M, Pfundt R, van der Valk PG, Blokx W, Dogan A, Hiemstra PS, van de Kerkhof PC, Schalkwijk J. High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis *J Invest Dermatol.* 2005;125:1163-1173.

Dean JH, Twerdok LE, Tice RR. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. II Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2001;34:258-273.

Degroot AC, Coenraads PJ, Bruynzeel DP, Jagtman BA, Van-Ginkel CJW, Noz K, Van-Der-Valk PGM, Pavel S, Vink J, Weyland JW. Routine patch testing with fragrance chemicals in The Netherlands. *Contact Dermatitis.* 2000;42:184-185.

Demoly P, Demoly MP. Les allergies. Arnaud Franel (Eds). 2001;5-7.

Dennerlein K, Schneider D, Göen T, Schaller KH, Drexler H, Korinth G. Studies on percutaneous penetration of chemicals - Impact of storage conditions for excised human skin. *Toxicol In vitro.* 2013; 27:708-713.

Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res.* 1997;14:568-1573.

Desobry S, Netto FM, Labuza TP. Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for β -carotene encapsulation and preservation. *J Food Sci.* 1997;62:1158-1162.

Dick CAJ, Brown DM, Donaldson K, Stone V. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol.* 2003;15:39-52.

Dickerson EB, Dreaden EC, Huang X, El-Sayed IH, Chu H, Pushpanketh S, McDonald JF, El-Sayed MA. Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice. *Cancer Lett.* 2008; 269:57-66.

Dickinson E. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids Interfaces B*. 2002;20:197–210.

Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Aït-Yahia S, Brière F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med*. 1998;188:373-386.

Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kensler TW. The role of Keap 1 in cellular protective responses. *Chem Res Toxicol*. 2005;18:1779-1791.

Directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (2010). http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexplus!prod!CELEXnumdoc&lg=FR&numdoc=32010L0063 (consulté le 02/10/2014).

Donaldson K, Brown D, Clouter A, Duffin R, Macnee W, Renwick L, Tran L, Stone V. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med*. 2002;15:213-220.

Donaldson, K, Borm, PJA, Oberdorster G, Pinkerton KE, Stone V, Tran CL. Concordance between *in vitro* and *in vivo* dosimetry in the preinflammatory effects of low toxicity, low solubility particles: the key role of the proximal alveolar region. *Inhal Toxicol*. 2008; 20:53-62.

Dragicevic-Curic N, Gräfe S, Gitter B, Winter S, Fahr A. Surface charged temoporfin-loaded flexible vesicles: *in vitro* skin penetration studies and stability. *Int J Pharm*. 2010; 384:100-108.

Duangjit S, Pamornpathomkul B, Opanasopit P, Rojanarata T, Obata Y, Takayama K, Ngawhirunpat T. Role of the charge, carbon chain length, and content of surfactant on the skin penetration of meloxicam-loaded liposomes. *Biomacromolecules*. 2014;9:2005-2017.

Dubois B, Chapat L, Goubier A, Kaiserlian D. CD4+CD25+ T cells as key regulators of immune responses. *Eur J Dermatol*. 2003;13:111-116.

Dubus P, Vergier B. Histologie cutanée. *Cosmétologie et Dermatologie esthétique*. 2000;50-010-A-10:1-9.

Dudda JC, Simon JC, Martin S. Dendritic cell immunization route determines CD8+ T cell trafficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets. *J Immunol*. 2004;172:857-863.

Dudhipala N, Veerabrahma K. Candesartan cilexetil loaded solid lipid nanoparticles for oral delivery: characterization, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. *Drug Deliv*. 2014:1-10.

Dugard PH. Skin permeability theory in relation to measurements of percutaneous absorption. In *toxicology*. Ed. Marzulli FN, Maibach HI. *Dermatology*, 2e Ed, New-York: Hemisphere, 1991, pp. 91-129.

Dungworth HR, Grey BD, Stockwell JR. Particles having surface properties and methods of making them. 2001; US 6329057.

Edele F, Molenaar R, Gütle D, Dudda JC, Jakob T, Homey B, Mebius R, Hornef M, Martin SF. Cutting edge: instructive role of peripheral tissue cells in the imprinting of T cell homing receptor patterns. *J Immunol*. 2008;181:3745-3749.

Edelson BT, KC W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, Moon C, Albring JC, Ise W, Michael DG, Bhattacharya D, Stappenbeck TS, Holtzman MJ, Sung SS, Murphy TL, Hildner K,

Murphy KM. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med*. 2010;207:823-836.

Egbaria K, Ramachandran C, Weiner N. Topical application of liposomally entrapped cyclosporin evaluated by *in vitro* diffusion studies with human skin. *Skin Pharmacol*. 1991;4:21-28.

Eilstein J, Giménez-Arnau E, Duché D, Cavusoglu N, Hussler G, Rousset F, Lepoittevin JP. Sensitization to p-amino aromatic compounds: Study of the covalent binding of 2,5-dimethyl-p-benzoquinonediimine to a model peptide by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Bioorg Med Chem*. 2008;16:5482-5489.

Einarson MB, Berg JC. Electrosteric stabilization of colloidal latex dispersions. *J Colloid Interface Sci*. 1993;155:165-172.

Elias PM, Choi EH. Interactions among *stratum corneum* defensive functions. *Exp Dermatol*. 2005;14:719-726.

Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol*. 1983;80: 44s-49s

Elias PM. *Stratum corneum* defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol*. 2005;125:183-200.

Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 beta in the initiation of primary immune responses in skin. *J Immunol*. 1993;150:3698-3704.

Fang JY, Fang CL, Liu CH, Su YH. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;70:633-640.

Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, Richie JP, Langer R. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:6315-6320.

Farré M, Pérez S, Gajda-Schranz K, Osorio V, Kantiani L, Ginebreda A, Barceló D. First determination of C60 and C70 fullerenes and N-methylfulleropyrrolidine C60 on the suspended material of wastewater effluents by liquid chromatography hybrid quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry. *J. Hydrol*. 2010;383:44-51.

Fartasch M, Bassukas ID, Diepgen TL. Structural relationship between epidermal lipid lamellae, lamellar bodies and desmosomes in human epidermis: an ultrastructural study. *Br J Dermatol*. 1993;128:1-9.

Feingold KR. The regulation and role of epidermal lipid synthesis. *Adv Lipid Res*. 1991;24:57-82.

Feldman RJ, Maibach HI. Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J Invest Dermatol*. 1970;54:399-404.

Feng T, Xiao Z, Tian H. Recent patents in flavor microencapsulation. *Recent Pat Food Nutr Agric*. 2009; 1:193-202.

Fessi F, Puisieux JP, Devissaguet, Ammoury N, Benita D. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm*. 1989;55:R1-R4.

Fischer LA, Menne T, Voelund A, Johansen JD. Can exposure limitations for well-known contact allergens be simplified? An analysis of dose-response patch test data. *Contact Dermatitis*. 2011;64: 337-342.

Fluhr JW, Behne MJ, Brown .E., Moskowitz D.G., Selden C., Mao-Qiang M. , *et al.* *Stratum corneum* acidification in neonatal skin: secretory phospholipase A2 and the sodium/hydrogen antiporter-1 acidify neonatal rat *stratum corneum*. J Invest Dermatol. 2004;122:320-329.

Franot C, Roberts DW, Basketter DA, Benezra C, Lepoittevin JP. Structure- activity relationships for contact allergenic potential of gamma,gamma-dimethyl-gamma- butyrolactone derivatives. 2. Quantitative structure-skin sensitization relationships for alpha- substituted-alpha-methyl-gamma, gamma-dimethyl-gamma-butyrolactones. Chem Res Toxicol.1994;7:307-312.

Franz TJ. Percutaneous absorption on the relevance of *in vitro* data. J Invest Dermatol. 1975;64:190-195.

Fredj D, Dietlin F. New method of encapsulation of volatile substances and phyto-aromatic compositions thereby obtained FR 2570604,1984.

Freinkel RK, Traczyk TN. Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis. J Invest Dermatol 1985;85:295-298.

Freitas C, Müller RH. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. Eur J Pharm Biopharm. 1999;47:125-32.

Frosch PJ, Pirker C, Rastogi SC, Andersen KE, Bruze M, Svedman C, Goossens A, White IR, Uter W, Arnau EG, Lepoittevin JP, Menne T, Johansen JD. Patch testing with a new fragrance mix detects additional patients sensitive to perfumes and missed by the current fragrance mix. Contact Dermatitis. 2005a;52:207-215.

Frosch PJ, Rastogi SC, Pirker C, Brinkmeier T, Andersen KE, Bruze M, SvedmanC, Goossens A, White IR, Uter W, Arnau EG, Lepoittevin JP, Johansen JD, Menne T. Patch testing with a new fragrance mix - reactivity to the individual constituents and chemical detection in relevant cosmetic products. Contact Dermatitis. 2005b;52:216-225.

Fubini B. Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. Environ Health Perspect. 1997;105:1013–1020.

Gamucci O, Bertero A, Malvindi MA, Sabella S, Pompa PP, Mazzolai B, Bardi G. Detection of fluorescent nanoparticle interactions with primary immune cell subpopulations by flow cytometry. J Vis Exp. 2014 ;85.

Garrett WS, Chen LM, Kroschewski R, Ebersold M, Turley S, Trombetta S, Galán JE, Mellman I. Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. Cell. 2000;102:325-334.

Gazagne A, Claret E, Wijdenes J, Yssel H, Bousquet F, Levy E, Vielh P, Scotte F, Goupil TL, Fridman WH, Tartour E. A Fluorospot assay to detect single T lymphocytes simultaneously producing multiple cytokines. J Immunol Methods. 2003;283:91-98.

Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. Nature. 1994;370:555-557.

Geiser M, Schurch S, Gehr P. Influence of surface chemistry and topography of particles on their immersion into the lung's surface-lining layer. J Appl Physiol. 2003;94:1793-1801.

Geissmann F, Launay P, Pasquier B, Lepelletier Y, Leborgne M, Lehuen A, Brousse N, Monteiro RC. A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes. J Immunol. 2001;166:346-352.

Geras A. Dermatology, a medical artist's interpretation. Sandoz Medical Publications (Ed.),1990;1-139.

Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, Basketter DA. A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis*. 2004;50:274-288.

Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin JP. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. 2007;97:417-427.

Giannavola C, Bucolo C, Maltese A, Paolino D, Vandelli MA, Puglisi G, Lee VH, Fresta M. Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded poly-d,l-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability. *Pharm Res*. 2003;20:584-590.

Gibson KH, Vorkel D, Meissner J, Verbavatz JM. Fluorescing the electron: strategies in correlative experimental design. *Methods Cell Biol*. 2014;124:23-54.

Gillet A, Compère P, Lecomte F, Hubert P, Ducat E, Evrard B, Piel G. Liposome surface charge influence on skin penetration behaviour. *Int J Pharm*. 2011;411:223-231.

Giordano-Labadie F, Rance F, Pellegrin F, Bazex J, Dutau G, Schwarze HP. Frequency of contact allergy in children with atopic dermatitis: results of a prospective study of 137 cases. *Contact Dermatitis*. 1999;40:192-195.

Giordano-Labadie. Composants parfumés. Nouvelles sources d'exposition aux allergènes de la batterie standard. *Rev Fr Allergol*. 2011;51:306-309.

Glavas-Dodov M, Goracinova K, Mladenovska K, Fredro-Kumbaradzi E. Release profile of lidocaine HCl from topical liposomal gel formulation. *Int J Pharm*. 2002; 242:381-384.

Gomez de Agüero M, Vocanson M, Hacini-Rachinel F, Taillardet M, Sparwasser T, Kissenpfennig A, Malissen B, Kaiserlian D, Dubois B. Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2012; 122:1700-1711.

Goossens A. Complexité des réactions allergiques aux « naturels » et du « tout bio ». *Progrès en dermato-allergologie*. Montrouge, France: John Libbey Eurotext ;2009 ;139-145.

Goossens A. Parfums, allergènes classiques et nouveaux : comment les tester ? *Progrès en dermato-allergologie*. Dijon, John Libbey. 2002;29–33.

Gorbachev AV, Fairchild RL. Induction and regulation of T-cell priming for contact hypersensitivity. *Crit Rev Immunol*. 2001;21:451-472.

Gossens A. Lepoittevin JP. Contact allergy to cosmetics and their perfume components: new clinical, chemical and diagnostic aspects. *Revue française d'allergologie et d'immunologie Clinique*. 2003;43:294-300.

Goubet I, Le Quere JL, Voilley A. Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physicochemical characteristics and of their physical state. *J Agr Food Chem*. 1998;48:1981-1990.

Goutayer M. Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques [Texte imprimé] : étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence *in vivo*. Thèse de doctorat en science effectué sous la direction Bibette J. Université Pierre et Marie Curie (Paris). 2008;1:1-242.

Grams YY, Bouwstra JA. Penetration and distribution of three lipophilic probes *in vitro* in human skin focusing on the hair follicle. *J Control Release*. 2002;83:253-262.

Green BK, Scheicher L. Pressure Sensitive Record Materials. 1955; US Patent N°2217507 Ncr C.

Greenwald RJ, Latchman YE, Sharpe AH. Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:391-396.

Gregoriadis G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts). *N Engl J Med*. 1976;295:765-770.

Grimbaldeston MA, Nakae S, Kalesnikoff J, Tsai M, Galli SJ. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol*. 2007;8:1095-1104.

Groen D, Gooris GS, Poncet M, Bouwstra JA. Two new methods for preparing a unique *stratum corneum* substitute. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778:2421-2429.

Gullapalli RP, Sheth BB. Influence of an optimized non-ionic emulsifier blend on properties of oil-in-water emulsions. *Eur J Pharm Biopharm*. 1999;48:233-238.

Güney G, Kutlu HM, Genç L3. Preparation and characterization of ascorbic acid loaded solid lipid nanoparticles and investigation of their apoptotic effects. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;121:270-280.

Guy RH, Delgado-Charro MB, Kalia YN. Iontophoretic transport across the skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14:S35-S40.

Guy RH, Hadgraft J. Mathematical models of percutaneous absorption. In: Bronaugh RL, Maibach HI (Ed.) *Percutaneous absorption*. 1989;13-27.

Hagvall L, Backtorp C, Norrby PO, Karlberg AT, Borje A. Experimental and theoretical investigations of the autoxidation of geranial: a dioxolane hydroperoxide identified as a skin sensitizer. *Chem Res Toxicol*. 2011;24:1507-1515.

Hagvall L, Backtorp C, Svensson S, Nyman G, Borje A, Karlberg AT. Fragrance compound geraniol forms contact allergens on air exposure. Identification and quantification of oxidation products and effect on skin sensitization. *Chem Res Toxicol*. 2007;20:807-814.

Hagvall L, Baron JM, Borje A, Weidolf L, Merk H, Karlberg A T. Cytochrome P450-mediated activation of the fragrance compound geraniol forms potent contact allergens. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;233:308-313.

Haniffa M, Gunawan M, Jardine L. Human skin dendritic cells in health and disease. *J Dermatol Sci*. 2014 [Epub ahead of print]

Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, Wasan PS, Wang XN, Malinarich F, Malleret B, Larbi A, Tan P, Zhao H, Poidinger M, Pagan S, Cookson S, Dickinson R, Dimmick I, Jarrett RF, Renia L, Tam J, Song C, Connolly J, Chan JK, Gehring A, Bertoletti A, Collin M, Ginhoux F. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity*. 2012;37:60-73.

Hawkins GS, Reifenrath WG. Influence of skin source, penetration cell fluid, and partition coefficient on *in vitro* skin penetration. *J Pharm Sci*. 1986;75:378-381.

Hedges A, McBride C. Utilization of β -cyclodextrin in food. *Cereal Foods World*. 1999;44:700-704.

Hegewald J, Uter W, Aberer W, Ayala F, Beliauskienė A, Belloni Fortina A, Bircher A, Brasch J, Chowdhury MM, Coenraads P J, Schüttelaer ML, Elsner P, English J, Fartasch M, Mahler V, Frosch PJ, Fuchs T, Gawkrödger DJ, Giménez-Arnau AM, Green CM, Johansen J D, Menné T, Jolanki R, King C M, Krecisz B, Kiec-Swierczynska M, Larese F, Ormerod A D, Orton D, Peserico A, Rantanen T, Rustemeyer T, Sansom JE, Statham BN, Corradin M T, Wallnofer W, Wilkinson M, Schnuch A. The European Surveillance System of Contact Allergies (ESSCA): results of patch testing the standard series, 2004. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;22:174-181.

Hendriks SA, Van Ginkel CJ. Evaluation of the fragrance mix in the European standard series. *Contact Dermatitis*. 1999;41:161-162.

Hong K, Park S. Preparation of poly(L-lactide) microcapsules for fragrant fiber and their characteristics. *Polymer*. 2000;41:4567-4572.

Howell MD. The role of human beta defensins and cathelicidins in atopic dermatitis *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7:413-417

Hu J, Xiao Z, Zhou R, Li Z, Wang M, Ma Z. Synthesis and characterization of polybutylcyanoacrylate-encapsulated rose fragrance nanocapsule. *Flavour Fragr J*. 2011;26:162–173.

Hyuk Suh W, Suslick SK, Stucky Galen D, SuhYoo-Hun. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Pro Neurobiol*. 2009;87:133-170.

Idson B. Percutaneous absorption. *J Pharm Sci*. 1975;64:901-924.

Igyarto BZ, Jenison MC, Dudda JC, Roers A, Müller W, Koni PA, Campbell DJ, Shlomchik MJ, Kaplan DH. Langerhans cells suppress contact hypersensitivity responses *via* cognate CD4 interaction and langerhans cell-derived IL-10. *J Immunol*. 2009;183:5085-5093.

Illel B. Formulation for transfollicular drug administration: Some recent advances. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1997;14:207-219.

ISO/TS 27687:2008. Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects — Nanoparticle, nanofibre and nanoplate.

Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J Biosci Bioeng*. 2005;100:1-11.

Jacobson GB, Gonzalez–Gonzalez E, Spitler R, Shinde R, Leake D, Kaspar RL, Contag CH, Zare RN. Biodegradable nanoparticles with sustained release of functional siRNA in skin. *J Pharm Sci*. 2010;99:4261–4266.

Jacquot M, Pernetti M. Spray coating and drying processes. In: *Cell Immobilization Biotechnology*. Nedovic U, Willaert R (ed). Focus on biotechnology. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2003; 343-356.

Jafar SM, Yinghe B, Bhesh B. Encapsulation of nanoparticles of d-limonene by spray drying: Role of emulsifiers and emulsifying techniques. *Drying technology*. 2007;24:4-6.

Jahnke S. The theory of high pressure homogenization, in: Muller RH, Benita S, Bohm B. editors. *Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs*. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers; 1998: 177-200.

Jenning V, Gysler A, Schafer-Korting M, Gohla SH. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur J Pharm Biopharm*. 2000;49:211–218.

- Jensen LB, Petersson K, Nielsen HM. *In vitro* penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011; 79:68-75.
- Jiang A, Bloom O, Ono S, Cui W, Unternaehrer J, Jiang S, Whitney JA, Connolly J, Banchereau J, Mellman I. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity.* 2007;27:610-624.
- Jong-Yea K. Preparation of nano-sized starch particles by complex formation with n-butanol. *Carbohydr Polym.* 2009;76:110-116.
- Jouquand C, Ducruet V, Giampaoli P. Partition coefficients of aroma compounds in polysaccharide solutions by the phase ratio variation method. *Food Chemistry.* 2004;85:467-474.
- Jung S, Patzelt A, Otberg N, Thiede G, Sterry W, Lademann J. Strategy of topical vaccination with nanoparticles. *J Biomed Opt.* 2009;14: 021001.
- Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, Miyachi Y, Inaba K, Narumiya S. Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat Med.* 2003;9:744-749.
- Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K, Mori T, Onoue A, Kobayashi M, Sakabe J, Yoshiki R, Tamamura H, Fujii N, Inaba K, Tokura Y. CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *Am J Pathol.* 2007;171:1249-1257.
- Kalish RS, LaPorte A, Wood JA, Johnson KL. Sulfonamide-reactive lymphocytes detected at very low frequency in the peripheral blood of patients with drug-induced eruptions. *J Allergy Clin Immunol.* 1994;94:465-472.
- Kandlikar M, Ramachandran G, Maynard A, Murdock B, Toscano WA. Health risk assessment for nanoparticles: A case for using expert judgment. *J. Nanop. Res.* 2007; 9: 137-156.
- Kaplan DH, Jenison MC, Saeland S, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity.* 2005;23:611-620.
- Karlberg AT, Börje A, Duus Johansen J, Lidén C, Rastogi S, Roberts D, Uter W, White IR. Activation of non-sensitizing or low-sensitizing fragrance substances into potent sensitizers - prehapten and prohapten. *Contact Dermatitis.* 2013 ; 69:323-334.
- Katsarma G, Gawkrödger DJ. Suspected fragrance allergy requires extended patch testing to individual fragrance allergens. *Contact Dermatitis.* 1999 ;41:193-197.
- Keck CM, Müller RH. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006;62:3-16.
- Keck CM, Schwabe K. Silver-nanolipid complex for application to atopic dermatitis skin: rheological characterization, *in vivo* efficiency and theory of action. *J Biomed Nanotechnol.* 2009;5:428-436.
- Keith AD, Snipes W. 1982. Phospholipids as moisturizing agents. In: Frost P, Horovitz S. (Eds.), *Principles of Cosmetics for the Dermatologist.* The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1982:59-69.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses *via* the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:89-116.
- Kerkhof PJAM. The role of theoretical and mathematical modelling in scale-up. *Drying Technology.* 1994;12:1-46.

Khayata N, Abdelwahed W, Chehna MF, Charcosset C, Fessi H. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: from laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *Int J Pharm*. 2012;423:419-427.

Kimber I, Dearman RJ, Basketter DA, Ryan CA, Gerberick GF. The local lymph node assay: past, present and future. *Contact Dermatitis*. 2002;47:315-328.

Kinez E, Kukovic M. Process for preparing carriers saturated or coated with microencapsulated scents. WO/1996/009114, 1996.

Kissenpfennig A, Ait-Yahia S, Clair-Moninot V, Stössel H, Badell E, Bordat Y, Pooley JL, Lang T, Prina E, Coste I, Gresser O, Renno T, Winter N, Milon G, Shortman K, Romani N, Lebecque S, Malissen B, Saeland S, Douillard P. Disruption of the langerin/CD207 gene abolishes Birbeck granules without a marked loss of Langerhans cell function. *Mol Cell Biol*. 2005;25:88-99.

Klinger T. Fundamentals of percutaneous chemical absorption and decontamination. *J Chem Health Saf*. 2007;1:11-15.

Knorr F, Lademann J, Patzelt A, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Follicular transport route-research progress and future perspectives. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71:173-180.

Kondo S, Kooshesh F, Wang B, Fujisawa H, Sauder DN. Contribution of the CD28 molecule to allergic and irritant-induced skin reactions in CD28 $-/-$ mice. *J Immunol*. 1996;157:4822-4829.

Koo OM, Rubinstein I, Onyuksel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: NBM*. 2005; 1:193-212.

Kopelman R, Lee Koo YE, Philbert M, Moffat BA, Reddy GR, McConville P, Hall DE, Chenevert TL, Bhojanie MS, Buck SM, Rehemtulla A, Ross BD. Multifunctional nanoparticle platforms for *in vivo* MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer. *J Magn Magn Mater*. 2005;293:404-410.

Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*. 2007; 448:484-487.

Krasteva M, Kehren J, Horand F, Akiba H, Choquet G, Ducluzeau MT, Tédone R, Garrigue JL, Kaiserlian D, Nicolas JF. Dual role of dendritic cells in the induction and down-regulation of antigen-specific cutaneous inflammation. *J Immunol*. 1998; 160:1181-1190.

Krasteva M, Kehren J, Sayag M, Ducluzeau MT, Dupuis M, Kanitakis J, Nicolas JF. Contact dermatitis II. Clinical aspects and diagnosis. *Eur J Dermatol*. 1999;9:144-159.

Krawczyk C, Oliveira-dos-Santos A, Sasaki T, Griffiths E, Ohashi PS, Snapper S, Alt F, Penninger JM. Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity*. 2002;16:331-343.

Kroto HW, Heath JR, O'Brien SR, Curl RF, Smalley RE. C60: Buckminsterfullerene. *Nature*, 1985;318:162-163.

Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med*. 2009;206:2937-2946.

Kühler S, Radowski MR, Blaschke T, Dathe M, Plendl J, Haag R, Schäfer-Korting M, Kramer KD. Nanoparticles for skin penetration enhancement--a comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009 ;71:243-250.

- Küchler S, Strüver K, Friess W. Reconstructed skin models as emerging tools for drug absorption studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9:1255-1263.
- Kumar C. Biological and Pharmaceutical Nanomaterials. *Nanotechnologies for life science*, Ed. 2. 2006, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim: 1-427.
- Kumar R, Singh B, Bakshi G, Katare OP. Development of liposomal systems of finasteride for topical applications: design, characterization, and *in vitro* evaluation. *Pharm Dev Technol*. 2007;12:591-601.
- La Chapelle JM. Le test épicutané : aperçu historique. Servinfo, Gist-Brocades (ed). 1996.
- Lademann J, Otberg N, Richter H, Weigmann HJ, Lindemann U, Schaefer H, Sterry W. Investigation of follicular penetration of topically applied substances. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14:S17-S22.
- Lademann J, Patzelt A, Richter H, Antoniou C, Sterry W, Knorr F. Determination of the cuticula thickness of human and porcine hairs and their potential influence on the penetration of nanoparticles into the hair follicles. *J Biomed Opt*. 2009;14:021014.
- Lademann J, Richter H, Golz K, Zastrow L, Sterry W, Patzelt A. Influence of microparticles on the homogeneity of distribution of topically applied substances. *Pharmacol Physiol*. 2008;21:274-82.
- Lademann J, Richter H, Teichmann A, Otberg N, Blume-Peytavi U, Luengo J, Weiss B, Schaefer UF, Lehr CM, Wepf R, Sterry W. Nanoparticles--an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;66 :159-164.
- Laforgue C, Marty JP. Absorption percutanée. *Ann Dermatol Venerol*. 2007;134:2S18-2S23.
- Lalani J, Rath M, Lalan M, Misra A. Protein functionalized tramadol-loaded PLGA nanoparticles: preparation, optimization, stability and pharmacodynamic studies. *Drug Dev Ind Pharm*. 2013;39:854-864.
- Lamprecht A, Ubrich N, Yamamoto H, Schäfer U, Takeuchi H, Lehr CM, Maincent P, Kawashima Y. Design of rolipram-loaded nanoparticles: comparison of two preparation methods. *J Control Release*. 2001;71:297-306.
- Larsen WG. Perfume Dermatitis. A Study of 20 Patients. *Arch Dermatol*. 1977;113: 623-626.
- Lauer AC, Lieb LM, Ramachandran C, Flynn GL, Weiner ND. Transfollicular drug delivery. *Pharm Res*. 1995;12:179-186.
- Laurent S, Martin L, Martin M, Fabien R. Oil-in-water emulsion and its use for the delivery of functionality. 2008; US 20080255247.
- Le Borgne M, Dubois B, Kaiserlian D. Cellules dendritiques des muqueuses et de la peau. « Recruter pour vacciner ». *M/S*. 2007;10:819-825.
- Lee HY, Lee SJ, Cheong IW, Kim JH. Microencapsulation of fragrant oil *via* in situ polymerization: effects of pH and melamine-formaldehyde molar ratio. *J Microencapsul*. 2002;19:559-569.
- Lee O, Jeong SH, Shin WU, Lee G, Oh C, Son SW. Influence of surface charge of gold nanorods on skin penetration. *Skin Res Technol*. 2013; 19:390-396.
- Lee SY, Krochta JM. Accelerated shelf life testing of whey protein coated peanuts analysed by static gas chromatography. *J Agr Food Chem*. 2002;50:2022-2028.

- Lenz A, Heine M, Schuler G, Romani N. Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J Clin Invest.* 1993;92:2587-2596.
- Leong TS, Wooster TJ, Kentish SE, Ashokkumar M. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrason Sonochem.* 2009;16:721-737.
- Lerch M, Keller M, Britschgi M, Kanny G, Tache V, Schmid DA, Beeler A, Gerber BO, Luethi M, Bircher AJ, Christiansen C, Pichler WJ. Cross-reactivity patterns of T cells specific for iodinated contrast media. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119:1529-1536.
- Li L, Wartchow CA, Danthi SN, Shen Z, Dechene N, Pease J, Choi HS, Doede T, Chu P, Ning S, Lee DY, Bednarski MD, Knox SJ. A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-Flk-1 antibody coated 90Y-labeled nanoparticles. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;58:1215-1227.
- Li MK, Foglirt HS. Acoustic emulsification, Part 1 and 2. *J. Fluid Mech.* 1978;88:499-528.
- Li Y, Ai L, Yokoyama W, Shoemaker CF, Wei D, Ma J, Zhong F. Properties of chitosan-microencapsulated orange oil prepared by spray-drying and its stability to detergents. *J Agric Food Chem.* 2013;61:3311-3319.
- Lindberg M, Edman B, Fischer T, Stenberg B. Time trends in Swedish patch test data from 1992 to 2000. A multi-centre study based on age- and sex- adjusted results of the Swedish standard series. *Contact Dermatitis.* 2007;56:205-210.
- Linkov I, Satterstrom FK, Corey LM. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. *Nanomedicine: Nanotech Bio and Med.* 2008;4:167–171.
- Liu J, Hu W, Chen H, Ni Q, Xu H, Yang X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *Int J Pharm.* 2007;328:191-195.
- Lunder T, Kansky A. Increase in contact allergy to fragrances: patch-test results 1989-1998. *Contact Dermatitis.* 2000;43:107-109.
- Lundstrom A, Serre G, Haftek M, Egelrud T. Evidence for a role of corneodesmosin, a protein which may serve to modify desmosomes during cornification, in *stratum corneum* cell cohesion and desquamation. *Arch Dermatol Res.* 1994;286:369-375.
- Machovcova A, Dastychova E, Kostalova D, Vojtechovska A, Reslova J, Smejkalova D, Vaneckova J, Vocilkova A. Common contact sensitizers in the Czech Republic. Patch test results in 12,058 patients with suspected contact dermatitis*. *Contact Dermatitis.* 2005;53:162-166.
- Madene A, Jacquot M, Scher J, Desobry S. Flavour encapsulation and controlled release - a review. *Int J Food Sci Tech.* 2006;41:1-21.
- Magdassi S, Mumcuoglu K, Bach U. Method of preparing natural-oil-containing emulsions and microcapsules and its uses. 1996; WO 1996/000056.
- Magenheim B, Levy MY, Benita S. A new *in vitro* technique for evaluation of drug release profile from colloidal carriers — ultrafiltration technique at low pressure. *Int J Pharm.* 1993;94:115-123.
- Magnusson B, Pugh W, Roberts M. Simple rules defining the potential of compounds for transdermal delivery or toxicity. *Pharm Res.* 2004;21:1047-1054.

Magnusson B, Runn P, Karlsson K, Koskinen LD. Terpenes and ethanol enhance the transdermal permeation of the tripeptide thyrotropin releasing hormone in human epidermis. *Int J Pharm.* 1997;157:113–121.

Magrez A, Kasas S, Salicio V, Pasquier N, Seo JW, Celio M, Catsicas S, Schwaller B, Forró L. Cellular Toxicity of Carbon-Based Nanomaterials. *Nano Letters.* 2006; 6:1121-1125.

Mahe B, Vogt A, Liard C, Duffy D, Abadie V, Bonduelle O, Boissonnas A, Sterry W, Verrier B, Blume-Peytavi U, Combadiere B. Nanoparticle-based targeting of vaccine compounds to skin antigen-presenting cells by hair follicles and their transport in mice. *J Invest Dermatol.* 2009; 129:1156-1164.

Mak WC, Richter H, Patzelt A, Sterry W, Lai KK, Renneberg R, Lademann J. Drug delivery into the skin by degradable particles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;79:23-27.

Malkusch W. High resolution as a key feature to perform accurate ELISPOT measurements using Zeiss KS ELISPOT readers. *Methods Mol Biol.* 2005;302:133-150.

Manojlovic V, Rajic N, Djonlagic J, Obradovic B, Nedovic V, Bugarski B. Application of Electrostatic Extrusion – Flavour Encapsulation and Controlled Release. *Sensors.* 2008;8:1488-96.

Markova NG, Marekov LN, Chipev CC, Gan SQ, Idler WW, Steinert PM. Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein *Mol Cell Biol.* 1993;13:613-625.

Martin SF, Esser PR, Weber FC, Jakob T, Freudenberg MA, Schmidt M, Goebeler M. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy.* 2011;66:1152-1163.

Martin SF, Merfort I, Thierse HJ. Interactions of chemicals and metal ions with proteins and role for immune responses. *Mini Rev Med Chem.* 2006; 6:247-255.

Martins IM, Rodrigues SN, Barreiro F, Rodrigues AE. Microencapsulation of thyme oil by coacervation. *J Microencapsul.* 2009; 26:667-675.

Mason TJ, Lormier JP. Sonochemistry : Theory, applications and uses of ultrasound in chemistry. . Ellis Horwood, Chichester. 1988.

Mathelier-Fusade P. Allergie aux parfums : quels tests pour quels conseils ? *Revue Française d'Allergologie.* 2009;49:366-370.

Mathelier-Fusade P. Allergie aux parfums : quels tests pour quels conseils ? *Revue Française d'Allergologie.* 2009;49:366-370.

Mauri-Hellweg D, Bettens F, Mauri D, Brander C, Hunziker T, Pichler WJ. Activation of drug-specific CD4+ and CD8+ T cells in individuals allergic to sulfonamides, phenytoin, and carbamazepine. *J Immunol.* 1995;155:462-472.

Mbah CC, Builders PF, Attama AA. Nanovesicular carriers as alternative drug delivery systems: ethosomes in focus. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014;11:45-159.

McLean WH, Novak N. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:214-219.

McNamee BF, O'Riordan ED, O'Sullivan M. Emulsification and microencapsulation properties of gum arabic. *J Agr Food Chem.* 1998;46:4551-4555.

Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;47:165-196.

Meidan VM, Bonner MC, Michniak BB. Transfollicular drug delivery--is it a reality? *Int J Pharm.* 2005;8;306:1-14.

Meyer W, Schwarz R, Neurand K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. *Curr Probl Dermatol.* 1978;7:39-52.

Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S. Quantum Dots for Live Cells, *in vivo* Imaging, and Diagnostics. *Science.* 2005;307:538-544.

Mitchell JC. The angry back syndrome: eczema creates eczema. *Contact Dermatitis.* 1975;1:193-194.

Mittal A, Raber AS, Schaefer UF, Weissmann S, Ebensen T, Schulze K, Guzmán CA, Lehr CM, Hansen S. Non-invasive delivery of nanoparticles to hair follicles: a perspective for transcutaneous immunization. *Vaccine.* 2013;31:3442-3451.

Miyazaki S, Takahashi A, Kubo W, Bachynsky J, Löebenberg R. Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: *in vitro* release and *in vivo* skin penetration. *J Pharm Pharm Sci.* 2003;6:238-245.

Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev.* 2001;53:283-318.

Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res.* 2003;42:463-478.

Monfardini C, Veronese FM. Stabilization of substances in circulation. *Bioconjug Chem.* 1998;9:418-450.

Monsalve-Gonzalez A, Ochomogo M. Natural flavor enhancement compositions for food emulsions. 2009; US 20090196972.

Morales J, Homey B, Vicari AP, Hudak S, Oldham E, Hedrick J, Orozco R, Copeland NG, Jenkins NA, McEvoy LM, Zlotnik A. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:14470-14475.

Morales-Cruz M, Flores-Fernández GM, Morales-Cruz M, Orellano EA, Rodriguez-Martinez JA, Ruiz M, Griebenow K. Two-step nanoprecipitation for the production of protein-loaded PLGA nanospheres. *Results Pharma Sci.* 2012;2:79-85.

Mordon S, Sumian C, Devoisselle JM. Site-specific methylene blue delivery to pilosebaceous structures using highly porous nylon microspheres: an experimental evaluation. *Lasers Surg Med.* 2003;33:119-125.

Mortensen LJ, Oberdörster G, Pentland AP, Delouise LA. *In vivo* skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model: the effect of UVR. *Nano Lett.* 2008;8:2779-2787.

Möschwitzer JP. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *Int J Pharm.* 2013;453:142-156.

Mozafari MR, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *J Liposome Res.* 2008;18:309-27.

Muchow M, Maincent P, Muller RH. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm.* 2008;34:1394-1340.

Mukherjee B, Patra B, Layek B, Mukherjee A. Sustained release of acyclovir from nano-liposomes and nano-niosomes: an *in vitro* study. *Int J Nanomedicine.* 2007;2:213-225.

Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000;50:161-177.

Müller RH, Mehnert W, Lucks JS, Schwarz C, zur Mühlen A, Weyhers H, Freitas C, Rühl D. Solid lipid nanoparticles (SLN) — An alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 1995;41:62-69.

Mutka JR, Nelson DB. Preparation of encapsulated flavors with high flavor level. *Food Technology.* 1988;42:154-157.

Nair VB, Panchagnula R. The effect of pretreatment with terpenes on transdermal iontophoretic delivery of arginine vasopressin. *Farmaco.* 2004;59:575-581.

Nanaki SG, Pantopoulos K, Bikiaris DN. Synthesis of biocompatible poly(ϵ -caprolactone)- block-poly(propylene adipate) copolymers appropriate for drug nanoencapsulation in the form of core-shell nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:2981-2995.

Nardelli A, Carbonez A, Ottoy W, Drieghe J, Goossens A. Frequency of and trends in fragrance allergy over a 15-year period. *Contact Dermatitis.* 2008;58:134-141.

Nardelli A, Thijs L, Janssen K, Goossens A. Rosa centifolia in a “non-scented” moisturizing body lotion as a cause of allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 2009; 61:306-309.

Natsch A, Emter R. Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the *in vitro* testing of the sensitization potential of chemicals. *Toxicol Sci.* 2008;102:110-119.

Natsch A. The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers--functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. *Toxicol Sci.* 2010;113:284-292.

Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science.* 2006;311:622-627.

Nemes Z, Marekov LN, Fesus L, Steinert PM. A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8402-8407.

Ness JN, Irving PV, Goodall MJ. Compositions containing perfume. 2001; US 6194375.

Nestle FO, Zheng XG, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol.* 1993;151:6535-6545.

Nethercott JR, Cooley JE. Getting the most out of patch-testing. *Curr Opin Dermat.* 1995;2:10-17.

Nethercott JR. Practical problems in the use of patch testing in the evaluation of patients with contact dermatitis. *Curr Probl Dermatol.* 1990;2:4.

Nielsen JB, Plasencia I, Sørensen JA, Bagatolli LA. Storage conditions of skin affect tissue structure and subsequent *in vitro* percutaneous penetration. *Skin Pharmacol Physiol.* 2011;24:93-102.

Nii T, Ishii F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *Int J Pharm.* 2005;298:198-205.

Noordegraaf M, Flacher V, Stoitzner P, Clausen BE. Functional redundancy of Langerhans cells and Langerin+ dermal dendritic cells in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 2010;130:2752-2759.

Nosbaum A, Vocanson M, Rozieres A, Hennino A, Nicolas JF. Allergic and irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol*. 2009;19:325-332.

Nyfeler B, Pichler WJ. The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy*. 1997;27:175-181.

Oberdo G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Inte Med*. 2010;267:89-105.

Oberdorster G, Stone V, Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*. 2007;1:2-25.

Oberdörster G. Significance of particle parameters in the evaluation of exposure-dose-response. 1996;8:73-889.

OECD. Organisation for economic co-operation and development. Guideline for the testing of chemicals. Skin absorption: *in vitro* method. OECD, Paris; 2004:1-72.

O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med*. 2004;10: 801-805.

Ohloff G. Scent and fragrances - The fascination of odors and their chemical perspectives, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1994:1-238.

Ostiguy C, Roberge B, Woods C, Soucy B. Les nanoparticules de synthèse : connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST. IRSST. 2010:1-159.

Ott H, Bergström MA, Heise R, Skazik C, Zwadlo-Klarwasser G, Merk HF, Baron JM, Karlberg AT. Cutaneous metabolic activation of carboxime, a self-activating, skin-sensitizing prohaptén. *Chem Res Toxicol*. 2009;22:399-405.

Ouali L, Benczedi D. Process for producing nanocapsules containing a fragrance. 2006; WO2006 027664.

Ouali L, Latreche D. Polymeric particles and fragrance delivery systems. 2004; EP 1443058.

Papakostas D, Rancan F, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Nanoparticles in dermatology. *Arch Dermatol Res*. 2011;303:533-550.

Parak WJ, Gerion D, Pellegrino T, Zanchet D, Micheel C, Williams SC, Boudreau R, Le Gros MA, Larabell CA, Alivisatos AP. Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology*. 2003;14:R15-R27.

Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm*. 2009;366:170-184.

Park JS, Yang HN, Woo DG, Jeon SY, Park KH. Multilineage differentiation of human-derived dermal fibroblasts transfected with genes coated on PLGA nanoparticles plus growth factors. *Biomaterials*. 2013; 34:582-97.

Patzelt A, Richter H, Dähne L, Walden P, Wiesmüller KH, Wank U, Sterry W, Lademann J. Influence of the vehicle on the penetration of particles into hair follicles. *Pharmaceutics*. 2011b;3:307-314.

Patzelt A, Richter H, Knorr F, Schäfer U, Lehr CM, Dähne L, Sterry W, Lademann J. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *J Control Release*. 2011a;150:45-8.

Perez-Anes A. Dendrimères phosphorés cationiques inhibiteurs du VIH: propriétés physic-chimiques et activité antivirale. Université de Toulouse. 2010;1:1-411.

Perrut M, Clavier JM. Supercritical Fluid Formulation: Process Choice and Scale-up. Ind Eng Chem Res. 2003;42:6375-6383.

Phipps LW. Mechanism of oil droplet fragmentation in high pressure homogenisers. Nature. 1971;233, 617-619.

Pichler WJ, Adam J, Daubner B, Gentinetta T, Keller M, Yerly D. Drug hypersensitivity reactions: pathomechanism and clinical symptoms. Med Clin North Am. 2010;94:645-664.

Pichler WJ, Tilch J. The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. Allergy. 2004;59:809-820.

Piérard GE, Petit L, Uhoda I, Piérard-Franchimont C, Henry de Hassonville S. Absorption cutanée. Encycl Méd Chir,), Cosmétologie et Dermatologie Esthétique. 2003;50-130-A-10:1-6.

Pinto-Alphandary H, Andremont A, Couvreur P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. Int J Antimicrob Agents. 2000;13:155-168.

Pompeu YA, Stewart JD, Mallal S, Phillips E, Peters B, Ostrov DA. The structural basis of HLA-associated drug hypersensitivity syndromes. Immunol Rev. 2012;250:158-166.

Pons-Guiraud A. Les allergies aux parfums en 2007. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique. 2007;47:232-236.

Pople PV, Singh KK. Development and evaluation of topical formulation containing solid lipid nanoparticles of vitamin A. AAPS PharmSciTech. 2006;7:91.

Posadas SJ, Torres MJ, Mayorga C, Juarez C, Blanca M. Gene expression levels of cytokine profile and cytotoxic markers in non-immediate reactions to drugs. Blood Cells Mol Dis. 2002;29:179-189.

Potts RO, Francoeur ML. The influence of *stratum corneum* morphology on water permeability. J Invest Dermatol. 1991;96:495-499.

Poux M, Canselier JP. Procédés d'émulsification – techniques et appareillage. Techniques de l'ingénieur. 2004; J2153:1-14.

Powers KV, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Roberts SM. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. 2006; 90:296-303.

Preining E. The physical nature of very, very small particles and its impact on their behaviour. J Aerosol Sci. 1998; 29:481-495.

Price AA, Cumberbatch M, Kimber I, Ager A. Alpha 6 integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis. J Exp Med. 1997;186:1725-1735.

Prost-Squarcioni C. Histologie de la peau et des follicules pileux. Médecine/Sciences. 2006;22:131-137.

Pustulka KM, Wohl AR, Lee HS, Michel AR, Han J, Hoyer TR, McCormick AV, Panyam J, Macosko CW. Flash nanoprecipitation: particle structure and stability. Mol Pharm. 2013;10:4367-4377.

Raison-Peyron N. Méthodologie des patch-tests : supports et allergènes. Annales de Dermatologie et de Vénéréologie. 2009;136:585-591.

Rancan F, Todorova A, Hadam S, Papakostas D, Luciani E, Graf C, Gernert U, Rühl E, Verrier B, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Stability of polylactic acid particles and release of fluorochromes upon topical application on human skin explants. *J Eur J Pharm Biopharm.* 2012;80:76-84.

Rastogi SC, Lepoittevin JP, Johansen JD, Frosch PJ, Menné T, Bruze M, Dreier B, Andersen KE, White IR. Fragrances and other materials in deodorants: search for potentially sensitizing molecules using combined GC-MS and structure activity relationship (SAR) analysis. 1998;39:293-303.

Ratzinger G, Baggers J, de Cos MA, Yuan J, Dao T, Reagan JL, Münz C, Heller G, Young JW. Mature human Langerhans cells derived from CD34+ hematopoietic progenitors stimulate greater cytolytic T lymphocyte activity in the absence of bioactive IL-12p70, by either single peptide presentation or cross-priming, than do dermal-interstitial or monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2004;173:2780-2791.

Rawlings AV, Matts PJ. *Stratum corneum* moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle. *J Invest Dermatol.* 2005;124:1099-1110.

Reantragoon R, Kjer-Nielsen L, Patel O, Chen Z, Illing PT, Bhati M, Kostenko L, Bharadwaj M, Meehan B, Hansen TH, Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J. Structural insight into MR1-mediated recognition of the mucosal associated invariant T cell receptor. *J Exp Med.* 2012;209:761-774.

Redoules D, Tarroux R, Perie J. Epidermal enzymes: their role in homeostasis and their relationships with dermatoses. *Skin Pharmacol. Appl Skin Physiol.* 1998;11:183-192

Regehly M, Greish K, Rancan F, Maeda H, Bohm F, Roder B. Water-soluble polymer conjugates of ZnPP for photodynamic tumor therapy. *Bioconjug Chem.* 2007;18:494–9.

Règlement européen n°1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques.

Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Théry C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med.* 1999;189:371-380.

Reineccius GA. Carbohydrates for flavor encapsulation. *Food Technology,* 1991;45:144–147.

Reineccius GA. Flavor encapsulation. *Food Rev Int.* 1989;5:147-176.

Renwick LC, Donaldson K, Clouter A. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;172:119-127.

Richard J, Benoît JP. Microencapsulation. *Techniques de l'ingénieur.* 2000;J2210:1–20.

Riemann H, Loser K, Beissert S, Fujita M, Schwarz A, Schwarz T, Grabbe S. IL-12 breaks dinitrothiocyanobenzene (DNTB)-mediated tolerance and converts the tolerogen DNTB into an immunogen. *J Immunol.* 2005;175:5866-5874.

Rifm. Local lymph node assay (LLNA) protocol summaries: Data presented at the 46th Congress of the European Societies of Toxicology. Research Institute for Fragrance Materials, Inc 2009.

Rippke F, Schreiner V, Schwanitz HJ. The acidic milieu of the horny layer: new findings on the physiology and pathophysiology of skin pH. *Am J Clin Dermatol.* 2002; 3: 261-272.

Rizvi SSH, Mulvaney SJ, Sokhey AS. The combined application of supercritical fluid and extrusion technology. *Trends Food Sci Tech.* 1995;6:232-240.

- Roguet R. The use of standardized human skin models for cutaneous pharmacotoxicology studies. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2002;15:1-3.
- Rolland A, Wagner N, Chatelus A, Shroot B, Schaefer H. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. *Pharm. Res.* 1993;10:1738-1744.
- Roustel S. Homogénéisation à haute pression des dispersions alimentaires solides. 2010;F2710:1-12.
- Rozieres A, Hennino A, Rodet K, Gutowski MC, Gunera-Saad N, Berard F, Cozon G, Bienvenu J, Nicolas JF. Detection and quantification of drug-specific T cells in penicillin allergy. *Allergy*. 2009;64:534-542.
- Saalbach A, Klein C, Sleeman J, Sack U, Kauer F, Gebhardt C, Aeverbeck M, Anderegg U, Simon JC. Dermal fibroblasts induce maturation of dendritic cells. *J Immunol*. 2007;178:4966-4974.
- Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity*. 1995;2:271-279.
- Sager TM, Porter DW, Robinson VA, Lindsley WG, Schwegler-Berry DE, Castranova V. Improved method to disperse nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* investigation of toxicity. *Nanotoxicol*. 2007;1:118-129.
- Saint-Mezard P, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JF. The role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol*. 2004;14:131-138.
- Saint-Mezard P, Chavagnac C, Bosset S, Ionescu M, Peyron E, Kaiserlian D, Nicolas JF, Berard F. Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions *in vivo*. *J Immunol*. 2003;171:4073-4080.
- Saint-Mezard P, Krasteva M, Chavagnac C, Bosset S, Akiba H, Kehren J, Kanitakis J, Kaiserlian D, Nicolas JF, Berard F. Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD. *J Invest Dermatol*. 2003;120:641-647.
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999; 401:708-712.
- Samah NA, Williams N, Heard CM. Nanogel particulates located within diffusion cell receptor phases following topical application demonstrates uptake into and migration across skin. *Int J Pharm*. 2010;40:172-178.
- Sansukcharearnpon A, Wanichwecharungruang S, Leepipatpaiboon N, Kerdcharoen T, Arayachukeat S. High loading fragrance encapsulation based on a polymer-blend: preparation and release behavior. *Int J Pharm*. 2010;31:267-273.
- Santamaria LF, Perez Soler MT, Hauser C, Blaser K. Allergen specificity and endothelial transmigration of T cells in allergic contact dermatitis and atopic dermatitis are associated with the cutaneous lymphocyte antigen. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;107:359-362.
- Santamaria-Babí LF. CLA(+) T cells in cutaneous diseases. *Eur J Dermatol*. 2004;14:13-18.
- Santos Maia C, Mehnert W, Schaller M, Korting HC, Gysler A, Haberland A, Schäfer-Korting M. Drug targeting by solid lipid nanoparticles for dermal use. *J Drug Target*. 2002;10:489-495.
- Sapra B, Jain S, Tiwary AK. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: mechanistic view. *AAPS J*. 2008;10:120-132.

Saraswat A, Agarwal R, Katare OP, Kaur I, Kumar B. A randomized, double-blind, vehicle-controlled study of a novel liposomal dithranol formulation in psoriasis. *J Dermatolog Treat.* 2007;18:40-45.

Saurat JH. Eczémas. In: Saurat JH, Grosshans E, Laugier P, Lachapelle JM (Ed.) *Dermatologie et vénéréologie.* Paris : Masson: 1990;29-70.

Schaefer H, Lademann J. The role of follicular penetration. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001;14:S23-S27.

Schaefer H, Redelmeier T. *Skin barrier: principles of percutaneous absorption.* Basel: Karger.1996. S. 43-86:1-14.

Schaefer H, Watts F, Brod J, Illel B: Follicular penetration. In: Scott RC, Guy RH, Hadgraft J (Eds). *Prediction of Percutaneous Penetration, Methods, Mesuarements, Modelling,* London: IBC Technical Service. 1990:163-173.

Schalmeus W. Centrifugal extrusion encapsulation. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredient.* Rish SJ, Reineccius GA (Ed). Washington, DC: American Chemical Society. 1995;96-103.

Scheuplein RJ, Bronaugh RL. Percutaneous absorption. In *Biochemistry and physiology of the skin.* New-York, Oxford Univ Press – La Goldsmith, 1983;1255-95.

Scheuplein RJ. Percutaneous absorption after twenty-five years: or "old wine in new wineskins". *J Invest. Dermatol.* 1976;67:31-38.

Schilling K, Bradford B, Castelli D, Dufour E, Nash JF, Pape W, Schulte S, Tooley I, van den Bosch J, Schellauf F. Human safety review of "nano" titanium dioxide and zinc oxide. *Photochem Photobiol Sci.* 2010;9:495-509.

Schins RP, Duffin R, Hohn D, *et al.* Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells. *Chem Res Toxicol.* 2002;15:1166–1173.

Schlupp P, Blaschke T, Kramer KD, Holtje HD, Mehnert W, Schafer-Korting M. Drug release and skin penetration from solid lipid nanoparticles and a base approach from a comparison of three glucocorticoids. *Skin cream: a systematic Pharmacol Physiol.* 2011;24:199–209.

Schmidt M, Raghavan B, Müller V, Vogl T, Fejer G, Tchaptchet S, Keck S, Kalis C, Nielsen PJ, Galanos C, Roth J, Skerra A, Martin SF, Freudenberg MA, Goebeler M. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol.* 2010;11:814-819.

Schneider M, Stracke F, Hansen S, Schaefer UF. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermatoendocrinol.* 2009;1:197-206.

Schnuch A, Lessmann H, Geier J, Frosch PJ, Uter W. Contact allergy to fragrances: frequencies of sensitization from 1996 to 2002. Results of the IVDK*. *Contact Dermatitis.* 2004 ;50:65-76.

Schnuch A, Uter W, Geier J, Lessmann H, Frosch PJ. Sensitization to 26 fragrances to be labelled according to current European regulation. Results of the IVDK and review of the literature. *Contact Dermatitis.* 2007;57:1-10.

Schobel AM. Encapsulated active agents, for instance encapsulated fragrances and flavours, and process therefrom. 1986; EP0170752.

Schroder JM, Harder J. Human beta-defensin-2. *Int J Biochem. Cell Biol.* 1999;31:645-651.

Schrurs F, Lison D. Focusing the research efforts. *Nature Nanotechnology.* 2012;7:546-548.

Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells *in vitro*. J Exp Med. 1985;161:526-546.

Schultz S, Wagner G, Urban K, Ulrich J. High-Pressure Homogenization as a Process for Emulsion Formation. Chem. Eng. Technol. 2004;27:361–368.

Schwarzenberger K, Udey MC. Contact allergens and epidermal proinflammatory cytokines modulate Langerhans cell E-cadherin expression *in situ*. J Invest Dermatol. 1996;106:553-558.

Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). Opinion on Fragrance allergens in cosmetics products. 2011; SCCS/1459/11:1-136.

Scientific Committee on Cosmetic and Non-Food Products (SCCNFP). Fragrance allergy in consumers. A review of the problem. Analysis of the need for appropriate consumer information and identification of consumer allergens. 1999; SCCNFP/0017/98:1-58.

Sempere LF. Integrating contextual miRNA and protein signatures for diagnostic and treatment decisions in cancer. Expert Rev Mol Diagn. 2011; 11:813-827.

Severino P, Santana MH, Souto EB. Optimizing SLN and NLC by 2(2) full factorial design: effect of homogenization technique. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2012;32:1375-1379.

Shahabeddin L, Berthold F, Damour O, Collombel C: Characterization of skin reconstructed on a chitosan cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix. Skin Pharmacol. 1990;3:107–114.

Shao L, Gao Y, Yan F. Semiconductor quantum dots for biomedical applications. Sensors (Basel). 2011;11:11736-11751.

Shefer A, Shefer SD. Multi component controlled release system for anhydrous cosmetic compositions. 2006; US7115282.

Sheu TY, Rosenberg M. Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. J. Food Sci. 1998;63:491-494.

Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. Immunity. 2006;25:195-201.

Shim J, Seok Kang H, Park WS, Han SH, Kim J, Chang IS. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. J Control Release. 2004;97:477-484.

Sibaud V, Redoules D. La barrière épidermique. Cosmétologie et Dermatologie esthétique. 2008; 50-020-B-10:1-8.

Simon GA, Maibach HI. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations—an overview. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 2000; 13: 229-234.

Singh B, Vuddanda PR, M R V, Kumar V, Saxena PS, Singh S. Cefuroxime axetil loaded solid lipid nanoparticles for enhanced activity against *S. aureus* biofilm. Colloids Surf B Biointerfaces. 2014;121:92-98.

Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, van Berlo D, Höhr D, Fubini B, Martra G, Fenoglio I, Borm PJ, Schins RP. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. Toxicol Appl Pharmacol. 2007;222:141-151.

Skazik C, Wenzel J, Marquardt Y, Kim A, Merk HF, Bickers DR, Baron JM. P-glycoprotein (ABCB1) expression in human skin is mainly restricted to dermal components. *Exp Dermatol*. 2011;20:450-452.

Smith A, Hunneyball IM. Evaluation of polylactid as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. *Int J Pharm*. 1986;30:215-230.

Song YK, Kim CK. Topical delivery of low-molecular-weight heparin with surface-charged flexible liposomes. *Biomaterials*. 2006;27:271-280.

Soper JC, Young KD, Magaret TT. Method of encapsulating flavors and fragrances by controlled water transport into microcapsules. 2000; US6045835A.

Soper JC. Method of encapsulating food or flavor particles using warm water fish gelatin, and capsules produced therefrom. 1996; WO 1996/020612

Souto EB, Mehnert W, Müller RH. Polymorphic behaviour of Compritol888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC. *J Microencapsul*. 2006;23:417-433.

Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Muller RH. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int J Pharm*. 2004;278:71-77.

Steinbrink K, Kolde G, Sorg C, Macher E. Induction of low zone tolerance to contact allergens in mice does not require functional Langerhans cells. *J Invest Dermatol*. 1996; 107:243-247.

Sumian CC, Pitre FB, Gauthier BE, Bouclier M, Mordon SR. A new method to improve penetration depth of dyes into the follicular duct: potential application for laser hair removal. *J Am Acad Dermatol*. 1999; 41:172-175.

Summer B, Paul C, Mazoochian F, Rau C, Thomsen M, Banke I, Gollwitzer H, Dietrich KA, Mayer-Wagner S, Ruzicka T, Thomas P. Nickel (Ni) allergic patients with complications to Ni containing joint replacement show preferential IL-17 type reactivity to Ni. *Contact Dermatitis*. 2010;63:15-22.

Suwannateep N, Wanichwecharungruang S, Fluhr J, Patzelt A, Lademann J, Meinke MC. Comparison of two encapsulated curcumin particular systems contained in different formulations with regard to *in vitro* skin penetration. *Skin Res Technol*. 2013;19:1-9.

Swisher HE. Solid flavouring composition and method of preparing same. 1958; US 2809895. Sunkist Growers Inc., Sherman Oaks, CA.

Tada H, Higuchi H, Wanatabe TM, Ohuchi N. *In vivo* real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice. *Cancer Res*. 2007;67:1138-1144.

Tamoutounour S, Guilliams M, Montanana Sanchis F, Liu H, Terhorst D, Malosse C, Pollet E, Ardouin L, Luche H, Sanchez C, Dalod M, Malissen B, Henri S. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*. 2013;39:925-38.

Tata S, Flynn GL, Weiner ND: Penetration of minoxidil from ethanol/propylene glycol solutions: Effect of application volume and occlusion. *J Pharm Sci*. 1995;84:688-691.

Teeguarden JG, Hinderliter PM, Orr G, Thrall BD, Pounds, JG. Particokinetics *in vitro*: dosimetry considerations for *in vitro* nanoparticle toxicity assessments. *Toxicol Sci*. 2007;95:300-312.

Teixeira Z, Zanchetta B, Melo BA, Oliveira LL, Santana MH, Paredes-Gamero EJ, Justo GZ, Nader HB, Guterres SS, Duran N. Retinyl palmitate flexible polymeric nanocapsules: characterization and permeation studies. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2010;81:374-380.

Temesvari E, Nemeth I, Balo-Banga MJ, Husz S, Kohanka V, Somos Z, Judak R, Remenyik E V, Szegedi A, Nebenfuhrer L, Meszaros C, Horvath A. Multicentre study of fragrance allergy in Hungary. Immediate and late type reactions. *Contact Dermatitis*. 2002;46:325-330.

Thies C. A survey of microencapsulation processes In *Microencapsulation: Methods and industrial applications*. Benita S (Ed), Marcel Dekker, New York, 1996:1-20.

Thyssen JP, Carlsen BC, Menne T, Johansen JD. Trends of contact allergy to fragrance mix I and *Myroxylon pereirae* among Danish eczema patients tested between 1985 and 2007. *Contact Dermatitis*. 2008;59:238-244.

Tinkle SS, Antonini JM, Rich BA, Roberts JR, Salmen R, DePree K, Adkins EJ. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect*. 2003;111:1202-1208.

Toll R, Jacobi U, Richter H, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J Invest Dermatol*. 2004;123:168-176.

Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Ryder J, Smith P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polymer*. 1985;17:117-132.

Torchilin VP. Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58:1532-1555.

Traidl-Hoffmann C, Mariani V, Hochrein H, Karg K, Wagner H, Ring J, Mueller MJ, Jakob T, Behrendt H. Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *J Exp Med*. 2005;201:627-636.

Trimaille T, Pichot C, Elaissari A, Fessi H, Briancon S, Delair T. Poly(D,L-lactic acid) nanoparticle preparation and colloidal characterization. *Colloid Polym Sci*. 2003;281:1184–1190.

Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing *in vitro* and *in vivo*. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23:975-1028.

Truchon G, Cloutier Y, Hallé S, Dolez P, Gautrin D, Lara J, Tardif R, Dufresne L, Morency F. Nanoparticules - Situation actuelle et pistes de recherche. Subvention de l'IRSST - rapport de recherche en évaluation. 2008;1-46.

Tsuang YH, Sun JS, Huang YC, Lu CH, Chang WH, Wang CC. Studies of photokilling of bacteria using titanium dioxide nanoparticles. *Artif Organs*. 2008;32:167-174.

Tsujimoto H, Hara K, Tsukada Y, Huang CC, Kawashima Y, Arakaki M, Okayasu H, Mimura H, Miwa N. Evaluation of the permeability of hair growing ingredient encapsulated PLGA nanospheres to hair follicles and their hair growing effects. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17:4771–4777.

Tsushima F, Iwai H, Otsuki N, Abe M, Hirose S, Yamazaki T, Akiba H, Yagita H, Takahashi Y, Omura K, Okumura K, Azuma M. Preferential contribution of B7-H1 to programmed death-1-mediated regulation of hapten-specific allergic inflammatory responses. *Eur J Immunol*. 2003;33:2773-2782.

Uhlemann J, Schleifenbaum B, Bertram HJ. Flavor encapsulation technologies: an overview including recent developments. *Perfumer and Flavorist*. 2002;27:52–61.

Uter W, Geier J, Frosch PJ, Schnuch A. Contact allergy to fragrances: current patch test results (2005 to 2008) from the IVDK network. *Contact Dermatitis*, 2010 ;63:254-261.

Uter W, Hegewald J, Aberer W, Ayala F, Bircher AJ, Brasch J, Coenraads PJ, Schuttelaar ML, Elsner P, Fartasch M, Mahler V, Belloni Fortina A, Frosch PJ, Fuchs T, Johansen JD, Menné T, Jolanki R,

Kręcisz B, Kiec-Swierczynska M, Larese F, Orton D, Peserico A, Rantanen T, Schnuch A. The European standard series in 9 European countries, 2002/2003 – First results of the European Surveillance System on Contact Allergies. *Contact Dermatitis*. 2005;26:53:136-145.

Uter W, Rääsch C, Aberer W, Ayala F, Balato A, Beliauskienė A, Fortina AB, Bircher A, Brasch J, Chowdhury M M, Coenraads P J, Schuttelaar M L, Cooper S, Corradin MT, Elsner P, English JS, Fartasch M, Mahler V, Frosch PJ, Fuchs T, Gawkrödger DJ, Gimenez-Arnau AM, Green CM, Horne HL, Jolanki R, King CM, Krecisz B, Kiec-Swierczynska M, Ormerod A D, Orton D I, Peserico A, Rantanen T, Rustemeyer T, Sansom J E, Simon D, Statham B N, Wilkinson M, Schnuch A. The European baseline series in 10 European Countries, 2005/2006-results of the European Surveillance System on Contact Allergies (ESSCA). *Contact Dermatitis*. 2009;61:31-38.

Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol*. 2005;17:273-283.

Van Oosten EJ, Schuttelaar ML, Coenraads P J. Clinical relevance of positive patch test reactions to the 26 EU-labelled fragrances. *Contact Dermatitis*. 2009;61:217-223.

Varman RM, Singh S. Investigation of effects of terpene skin penetration enhancers on stability and biological activity of lysozyme. *AAPS PharmSciTech*. 2012;13:1084-1090.

Venuganti VV, Sahdev P, Hildreth M, Guan X, Perumal O. Structure-skin permeability relationship of dendrimers. *Pharm Res*. 2011; 28:2246-2260.

Verma DD, Verma S, McElwee KJ, Freyschmidt-Paul P, Hoffman R, Fahr A. Treatment of alopecia areata in the DEBR model using Cyclosporin A lipid vesicles. 2004;14:332–338.

Viraben R, Aquilina C, Cambon L, Bazex J. Allergic contact dermatitis in HIV-positive patients. *Contact Dermatitis*. 1994;31:326-327.

Vocanson M, Hennino A, Cluzel-Tailhardat M, Saint-Mezard P, Benetiere J, Chavagnac C, Berard F, Kaiserlian D, Nicolas JF. CD8⁺ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice. *J Invest Dermatol*. 2006;126:815-820.

Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Cluzel-Tailhardat M, Poyet G, Valeyrie M, Bénétière J, Tédone R, Kaiserlian D, Nicolas JF. Skin exposure to weak and moderate contact allergens induces IFN γ production by lymph node cells of CD4⁺ T-cell-depleted mice. *J Invest Dermatol*. 2009a;129:1185–1191.

Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*. 2009b;64:1699-1714.

Vocanson M, Rozières A, Hennino A, Poyet G, Gaillard V, Renaudineau S, Achachi A, Benetiere J, Kaiserlian D, Dubois B, Nicolas JF. Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126:280-289.

Vogt A, Combadiere B, Hadam S, Stieler KM, Lademann J, Schaefer H, Autran B, Sterry W, Blume-Peytavi U. 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a⁺ cells after transcutaneous application on human skin. *J Invest Dermatol*. 2006;126:1316-322.

Vogt A, Hadam S, Heiderhoff M, Audring H, Lademann J, Sterry W, Blume-Peytavi U. Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. *Exp Dermatol*. 2007;16:946-950.

Walzer T, Marçais A, Saltel F, Bella C, Jurdic P, Marvel J. Cutting edge: immediate RANTES secretion by resting memory CD8 T cells following antigenic stimulation. *J Immunol*. 2003;170:1615-1619.

Wang B, Kondo S, Shivji GM, Fujisawa H, Mak TW, Sauder DN. Tumour necrosis factor receptor II (p75) signalling is required for the migration of Langerhans' cells. *Immunology*. 1996;88:284-288.

Weather P, Young B, Heath J. La peau. *Histologie fonctionelle*, De Boeck (Ed.).2001;165-166.

Weber FC, Esser PR, Müller T, Ganesan J, Pellegatti P, Simon MM, Zeiser R, Idzko M, Jakob T, Martin SF. Lack of the purinergic receptor P2X(7) results in resistance to contact hypersensitivity. *J Exp Med*. 2010 Nov 22;207:2609-2619.

Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, Klopp N, Wagenpfeil S, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Palmer CN, Jenneck C, Maintz L, Hagemann T, Behrendt H, Ring J, Nothen MM, McLean WH, Novak N. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:214-219.

Weiss JM, Renkl AC, Maier CS, Kimmig M, Liaw L, Ahrens T, Kon S, Maeda M, Hotta H, Uede T, Simon JC. Osteopontin is involved in the initiation of cutaneous contact hypersensitivity by inducing Langerhans and dendritic cell migration to lymph nodes. *J Exp Med*. 2001;194:1219-1229.

Weltzien HU, Martin SF, Nicolas JF. T cell responses to contact allergens. *EXS*. 2014;104:41-49.

Whitaker DM. Stabilized perfume-containing microcapsules and method of preparing the same. 1991; US5051305.

Williams PA, Phillips GO. Gum arabic. In: *Handbook of Hydrocolloids*. Phillips GO, Williams PA. (ed), Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2000:55-68.

Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol*. 2008;53:R61-R109.

Wissing SA, Kayser O, Müller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56:1257-1272.

Wöhrl S, Hemmer W, Focke M, Götz M, Jarisch R. The significance of fragrance mix, balsam of Peru, colophony and propolis as screening tools in the detection of fragrance allergy. *Br J Dermatol*. 2001;145:268-273.

Wosicka H, Cal K. Targeting to the hair follicles: current status and potential. *J Dermatol Sci*. 2010;57:83-89.

Wust P, Gneveckow U, Johannsen M, Böhmer D, Henkel T, Kahmann F, Sehouli J, Felix R, Ricke J, Jordan A. Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy--feasibility, tolerance and achieved temperatures. *Int J Hyperthermia*. 2006;22:673-685.

Xiong S, Zhao X, Heng BC, Ng KW, Loo JS. Cellular uptake of Poly-(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles synthesized through solvent emulsion evaporation and nanoprecipitation method. *Biotechnol* . 2011;6:501-508.

Xu H, Dilulio NA, Fairchild RL. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1996;183:1001-1012.

Yamato Y, Yoshida T, Kikuchi M, Okamoto M, Miyoshi K, Fukuda S, Fuse T, Yamauchi T, Ogawa Y, Mutagami S, Mizukami Y. Microcapsule, treatment liquid containing microcapsules, and textile structure having microcapsules stuck thereto. WO/1991/001801, 1991.

Yang J, Lim EK, Lee HJ, Park J, Lee SC, Lee K, Yoon HG, Suh JS, Huh YM, Haam S. Fluorescent magnetic nanohybrids as multimodal imaging agents for human epithelial cancer detection. *Biomaterials*. 2008;29:2548-2555.

Yang Y, Sunoqrot S, Stowell C, Ji J, Lee CW, Kim JW, Khan SA, Hong S. Effect of size, surface charge, and hydrophobicity of poly(amidoamine) dendrimers on their skin penetration. *Biomacromolecules*. 2012;13:2154-2162.

Yen FL, Wu TH, Tzeng CW, Lin LT, Lin CC. Curcumin nanoparticles improve the physicochemical properties of curcumin and effectively enhance its antioxidant and antihepatoma activities. *J Agric Food Chem*. 2010;58:7376-7382.

erramsetty KM, Rachakonda VK, Neely BJ, Madihally SV, Gasem KA. Effect of different enhancers on the transdermal permeation of insulin analog. *Int J Pharm*. 2010;398:83–92.

Yoo J, Shanmugam S, Song CK, Kim DD, Choi HG, Yong CS, Woo JS, Yoo BK. Skin penetration and retention of L-ascorbic acid 2-phosphate using multilamellar vesicles. *Arch Pharm Res*. 2008;31:1652-1658.

Yoshii H, Soottitantawat A, Liu XD, Atarashi T, Furuta T, Aishima S, Ohgawara M, Linko P. Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. *Innov Food Sci Emerg Tech*. 2001;2:55-61.

Young SL, Sarda X, Rosenberg M. Microencapsulating properties of whey proteins. 2. Combination of whey protein with carbohydrates. 1993b;76:2878-2885.

Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Steinman RM, Krueger JG, Lowes MA. Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *J Clin Invest*. 2007;117:2517-2525.

Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002;415:389-395.

Zhang J, Smith E. Percutaneous permeation of betamethasone 17-valerate incorporated in lipid nanoparticles. *J Pharm Sci*. 2010;100:896–903.

Zhang Z, Huey Lee S, Feng SS. Folate-decorated poly(lactide-co-glycolide)-vitamin E TPGS nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomaterials*. 2007;28:1889-1899.

Zhao L, Li N, Wang K, Shi C, Zhang L, Luan Y. A review of polypeptide-based polymersomes. *Biomaterials*. 2014;35:1284-1301.

Zuang V, Balls M, Botham PA, Coquette A, Corsini E, Curren RD, Elliott GR, Fentem JH, Heylings JR, Liebsch M, Medina J, Roguet R, van de Sandt JJ, Wiemann C, Worth AP. Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2. *Altern Lab Anim*. 2002;30:109-129.

NOUVELLES APPLICATIONS DES NANOPARTICULES ORGANIQUES : DE LA VECTORISATION D'UN MELANGE D'ACTIFS À TRAVERS LA PEAU JUSQU'AU DEVELOPPEMENT D'UN TEST DIAGNOSTIQUE *IN VITRO* DE L'ALLERGIE AUX PARFUMS

Les nanoparticules (NPs) organiques représentent un outil majeur d'innovation en dermatologie.

L'objectif de cette thèse a été de développer et d'optimiser des procédés d'encapsulation d'un mélange de molécules odorantes appelé fragrance mix I (FMI) dans des nanoparticules (NPs) de différentes natures: NPs polymères (poly-ε-caprolactone, PCL), ou NPs lipidiques solides (SLNs) (à base de vaseline, beurre de karité, cire de candelilla, triglycérides C10-18, ou palmitate de cétyle). Ces nouveaux systèmes ont alors été évalués pour la vectorisation de ce mélange à travers un explant de peau de porc, afin de modéliser la distribution des molécules composant le FMI dans les différentes assises cutanées. En parallèle, elles ont également été appliquées en tant que promoteurs de solubilisation du FMI pour le développement d'un nouveau test de diagnostic *in vitro* de l'allergie aux parfums.

Nos résultats montrent que: (i) les NPs polymères, principalement anioniques, sont les plus adaptées pour promouvoir la pénétration transépidermique du FMI. Au contraire, les SLNs s'agglomèrent dans le *stratum corneum*, conduisant à une accumulation du FMI dans cette assise ; (ii) qu'au-delà du type de vecteur utilisé, la pénétration des molécules du FMI dans les couches les plus profondes de la peau dépend de leur coefficient de partage intrinsèque ; (iii) que les nanoparticules de PCL augmentent significativement la solubilisation du FMI dans les milieux de culture conventionnels et permettent ainsi une réactivation robuste des lymphocytes T spécifiques circulant chez des patients présentant une allergie aux parfums.

L'ensemble de ces résultats confirme donc tout le potentiel des NPs organiques pour le développement de futures stratégies de délivrance ciblée de plusieurs actifs dans les différents compartiments cutanés. Ces nouveaux vecteurs offrent en outre une alternative prometteuse pour améliorer le diagnostic de l'eczéma de contact induit par les parfums et plus généralement par des allergènes hydrophobes.

MOT-CLES : Allergie, Diagnostic, Eczéma allergique de contact, Fragrance Mix I, Nanoparticules polymères, Nanoparticules lipidiques solides, Pénétration cutanée.

NEW APPLICATIONS OF ORGANIC NANOPARTICLES: VECTORISATION OF MIX THROUGH THE SKIN AND DEVELOPMENT OF *IN VITRO* ASSAY FOR THE DIAGNOSIS OF FRAGRANCE ALLERGY

The aim of this work was to develop and optimize methods for fragrance mix I (FMI) encapsulation into nanoparticles (NPs) of two types of nanoparticles (NPs) : polymeric NPs (poly-ε-caprolactone, PCL) and solid lipid NPs (SLNs) (prepared with petrolatum, shea butter, candelilla wax, C10-18 triglycerides, or cetyl palmitate). Then, these new NPss were evaluated as vectors through a pig skin to analyze the distribution of the FMI molecules in the different skin layers. In parallel, NPs have also been applied as solubilizers for the development of a new *in vitro* test for the diagnosis of fragrance allergy.

Our results show that (i) NPs polymers, mainly anionic NPs, are the most suitable vectors to promote trans-epidermal penetration of fragrance. On the contrary, SLNs were found in the *stratum corneum*, leading to an accumulation of fragrance in this layer; (ii) whatever the type of NPs, the penetration of the FMI molecules in the deeper layers of the skin depends on their intrinsic partition coefficient; (iii) PCL-NPs significantly increase the FMI solubilization in conventional culture media and, allowing a robust reactivation of circulating specific T cells in patients with allergy to fragrances.

All of these results confirm the potential of organic NPs for the development of future strategies (for the skin delivery of several actives in the different skin layers). These new vectors further offer a promising alternative to improve the diagnosis of contact dermatitis induced by fragrances and more generally by hydrophobic allergens.

KEY WORD: Allergy, Diagnosis, Allergic contact dermatitis, Fragrance Mix I, Polymeric nanoparticles, Solid lipid nanoparticles, Skin delivery.

DISCIPLINE: Ingénierie biologique et médicale, biotechnologie

Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), UMR CNRS 5007,
Université Claude Bernard Lyon 1, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.
CIRI, INSERM U1111, 21 Avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France.